

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

**Papel de los receptores de IGF1 e insulina en el desarrollo y
funcionalidad del tejido adiposo marrón: regulación del balance
energético**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Vanesa Viana Huete

Director

Manuel R. Benito de las Heras

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

Tesis Doctoral

Papel de los receptores de IGF1 e insulina en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón: regulación del balance energético

Director de la tesis

Dr. Manuel R. Benito de las Heras

Vanesa Viana Huete

Madrid, 2017

Tesis Doctoral

Papel de los receptores de IGF1 e insulina en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón: regulación del balance energético

Esta memoria ha sido presentada por la licenciada Vanesa Viana Huete para optar al grado de Doctor por el programa de doctorado RD1393/2007 de la Universidad Complutense de Madrid.

Director de la tesis

Dr. Manuel R. Benito de las Heras

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y financiado por una beca del consorcio MOIR y por los proyectos de investigación CAM S2010/BMD-2423, MINECO SAF2011/22555 y SAF2014-51795-R y CIBERDEM PIE14/00061.

Por fin después de tanto escribir, ¡ha llegado mi parte favorita!

De los cientos de refranes que habitualmente suelo utilizar y los cuales muchos de vosotros los habéis sufrido a diario, quiero empezar con ese que dice: “Es de bien nacido, ser agradecido”.

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres su apoyo incondicional en cada una de las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida, fueran correctas o no siempre han estado ahí para mí y me siento muy afortunada por ello. Sobre todo, mil gracias por animarme siempre a seguir el camino que escogí hace ya tiempo atrás y por ayudarme a levantarme en cada uno de mis tropiezos. También quiero agradecer el haber llegado hasta aquí a mi abuelo Santiago, un hombre humilde y trabajador el cual a pesar de no tener estudios siempre me inculcó lo importante que era estudiar y trabajar duro por lo que uno quiere en la vida. Aunque desgraciadamente ya no estás aquí para acompañarme en este día tan importante, recordaré tu risilla tan especial para disfrutarlo como a ti te habría gustado. También quiero agradecer a Ángel por ser mi apoyo durante tantos años, ayudarme cuando lo he necesitado y sobre todo gracias por todos esos fines en los que me acompañaste mientras estudiaba para hacerme la tarea más llevadera. Gracias a mis amigos Eva, Jesús y David que siempre me han apoyado en todo y han estado ahí siempre para darme ánimos.

Quiero agradecer a Sabe o como yo la llamo “el bicho”. Ese bicho que ha sido amiga, compañera y casi una hermana para mí desde que nos conocimos hace ya casi 8 años. Desde nuestros comienzos en Inmuno hasta hoy, he tenido la gran suerte de poder haber compartido contigo: experimentos, viajes, llantos, risas, fiestas, broncas, mo-

mentos de Engendros, croquetas explosivas y hasta momentos poéticos. Un sin fin de recuerdos que siempre voy a llevar conmigo y por los que hoy quiero darte las gracias. Gracias por ser mi apoyo en mis momentos de crisis y estar siempre que te he necesitado, aunque estuvieras a cientos de kilómetros. Para mí y sobre todo para mi vocabulario ha sido una suerte que te cruzaras en mi camino, los ahora después ya no son lo mismo sin ti.

Ahora le toca el turno a mis “chic@s” ese grupo amig@s y compañer@s con los que he compartido mil y una historias. A Tamaroa, gracias por estar siempre ahí para tranquilizarme y hacerme ver las cosas desde otro punto de vista, gracias por poner de moda la “hora del té” en la que puede compartir contigo y con Sabe cientos de buenos momentos, por las clases de papiroflexia, por ser mi soporte estadístico de emergencia y sobre todo gracias por ser mi amiga. A Elisa, millones de gracias por tu ayuda a nivel científico y personal, junto con Tamara vosotras habéis sido como mis hermanas mayores, echando broncas cuando hacía falta y blasfemando conmigo para hacerme más llevadero mis tropiezos. Eres una buena amiga y una mejor científica, gracias por compartir conmigo comidas, cafés, charlas y sobre todo gracias por dejarme tu hombro cuando lo he necesitado. A Esther, mi compañera de congresos favorita, siempre recordaré ese viaje a Barcelona y el empeño que pusiste en hacerme de reír para que olvidara mis miedos. Gracias por ser mi compañera de Coca-Colas, por los paseos por el Botánico y por esos llamamientos desde la otra punta del departamento que siempre me hacían tanta gracia. A Deivid, gracias por las eternas sobremesas, por hacer de personal trainer, por instruirme en el mundo del gin y sobre todo gracias por sacarme siempre una sonrisa cuando más lo necesitaba. A Irene, gracias por ser la alegría de este grupo, porque tu locura siempre nos ha hecho olvidar todas las penas y porque el tiempo contigo siempre se pasa volando. A mis niñas Ángela y María, dos chicas estupendas que comenzaron sus andanzas en el laboratorio 21 y que poco a poco me fueron ganando con su bondad y su alegría, gracias por hacerme más llevadero el tiempo que compartimos en el laboratorio. Gracias en especial a Ángela, con la que tuve la suerte de trabajar codo a codo y pasar horas infinitas en el cuarto de cultivos, muchas veces pasamos malos momentos, pero juntas se hicieron mucho más pequeños. Eres un sol de persona y tenerte como amiga es una suerte.

Llegó el turno de mis Biolokillas, ese grupo de amigas que conservo desde mis comienzos en Biología y con las que he compartido gran parte de mi vida. A Vicky, mi amiga y mi apoyo de siempre, mi compañera de fiestas y locuras, gracias por estar siempre a mi lado y por compartir tantos buenos momentos conmigo. A Soni, por ser la

sensatez dentro de un grupo de locas, por buscarnos siempre sitios ricos donde comer, por proponer siempre planes para sacarnos de casa y por tu apoyo en los últimos tiempos. A Isa, mi yo loco, por esas risas cómplices, por sacarme de casa arrastra, por sacar siempre un hueco para hablar y porque sí, porque eres la alegría y la locura de este grupo. A Tati, gracias por hacerme ver las cosas de otra manera y por ese buen rollo que nos trasmite a todas. A Roci, por enseñarme canciones raras y por los buenos momentos de Cancún donde realmente descubrí a la verdadera Rocío, divertida, positiva y sobre todo buena amiga. A Laura, a la futura mami del grupo, gracias por los momentos compartidos en los viejos tiempos, los cuales espero retomemos nuevamente.

Gracias a los Inmunitos. Gracias a Juanolas, por enseñarme en mis comienzos, gracias por tu paciencia infinita y por contagiarme tu pasión por la Ciencia, no podría haber tenido un mejor maestro que tú. Además de eso, gracias por ser mi amigo y por ser un gran apoyo para mí en los momentos difíciles. A Marina y Ana Vi, el clan maligno de los inmunitos, gracias por compartir conmigo los momentos más divertidos que recuerdo de mi paso por Inmuno. A Carmen, por ser una buena compañera, por mantenernos firmes cuando era necesario y por mostrarme que la sangría de sidra también existe. A Bea, gracias por los momentos compartidos y por las divertidas sobremesas. A mi pelirroja favorita, Iria, gracias por tus momentos karaoke que me alegraban las mañanas y por ayudarme siempre que lo necesité.

Gracias a mi pequeña familia Bostoniana, a Javi, gracias por hacerme un hueco, por tu ayuda, por ser mi guía turístico, por enseñarme los sitios de comida más ricos y por ser mi amigo cuando no tenía a nadie más. A María, gracias por compartir tus aficiones culinarias conmigo, por ser confidente y amiga y sobre todo gracias por haberte leído esta tesis. A Vero, por incluirme siempre en tus planes y por estar pendiente de mi aun estando a miles de Km. A Olga, gracias por compartir conmigo conciertos y enseñarme los mejores lugares de Boston. A Sunny, por esa bonita sonrisa que me hizo todos los días mucho más llevaderos. A Diego, Kike, Jorge, Flo, Edu y Alejo por hacerme sentir una más en vuestro grupo.

En el terreno científico, dar las gracias a Manuel por confiar en mí durante todos estos años y darme la oportunidad de embarcarme en un tema totalmente nuevo para mí.

Dar las gracias a Orian por darme la oportunidad de unirme a su laboratorio y hacerme sentir como un miembro más desde el primer día. A Marc, gracias por guiarme durante mi estancia, por su apoyo,

por resolverme miles de dudas durante todo este tiempo y revisarte esta tesis en tiempo record. Gracias a Eleni, Sushi, Kiana, Nour, Marcus, Toño, Nate, Ilan, Kale y Dane por su ayuda diaria en el laboratorio y por hacerme mi estancia en Boston tan agradable.

Al laboratorio 21, dar las gracias a Gema y Silvia por su ayuda, su colaboración en gran parte de esta tesis y por su apoyo en los últimos tiempos. A Óscar y Almudena por ayudarme siempre que lo he necesitado. A Raquel, por todos los momentos de trabajo mano a mano compartidos en cultivos, por tu contribución a esta tesis y por tu alegría y apoyo diarios. A Andrea, porque eres bondad pura y siempre es de agradecer poder trabajar con personas como tú. A Nuria por las infinitas horas compartidas en el labo. A Jesús por el buen rollo que transmites a todos los que te rodean. A Carlos y Ana por su colaboración en los dos artículos derivados de esta tesis. A Elena por gestionar todo lo que necesitamos y hacernos más fácil nuestro trabajo diario.

A Ale, por poner esta tesis bonita.

Por último, agradecer a todas las piedras que me he encontrado a lo largo de este camino porque gracias a ellas he aprendido a encontrar caminos alternativos, a disfrutar del viaje y buscar apoyos para seguir adelante.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

21 - **RESUMEN**

29 - **SUMMARY**

37 - **ABREVIATURAS**

43 - **1. INTRODUCCIÓN.**

1.1 Obesidad y complicaciones asociadas.

1.1.1 La obesidad en la actualidad.

1.1.2 Concepto y tipos de obesidad.

1.1.3 Fisiopatología de la obesidad.

1.1.4 Complicaciones asociadas: síndrome metabólico.

1.1.4.1 Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

1.1.4.2 Dislipidemia

1.1.4.3 Hígado graso no alcohólico.

1.1.4.4 Complicaciones cardiovasculares.

1.1.4.5 Cáncer.

1.1.4.6 Complicaciones respiratorias.

1.2. El órgano adiposo.

1.2.1 Tejido adiposo blanco.

1.2.1.1 Estructura y localización.

1.2.1.2 Diferenciación y desarrollo.

1.2.1.3 Funcionalidad.

1.2.2 Tejido adiposo marrón.

1.2.2.1 Estructura y localización

1.2.2.2 Diferenciación y desarrollo.

1.2.2.3 Funcionalidad del tejido adiposo marrón

1.2.2.4 El tejido adiposo marrón en humanos.

1.2.2.5 Papel del tejido adiposo marrón como terapia antiobesidad.

1.2.2.6 La mitocondria en el tejido adiposo marrón.

- Dinámica mitocondrial y su papel en el tejido adiposo marrón.

- Mecanismos de calidad citoplasmática: mitofagia.

1.2.3 Tejido adiposo *beige*.

1.3 Insulina e IGF1 en tejido adiposo marrón.

1.3.1 Insulina e IGF1.

1.3.2 Receptores e isoformas.

1.3.3 Vías de señalización celular.

1.3.4 Importancia del receptor de insulina (IR) y del receptor de IGF1 (IGF1R) en el desarrollo del tejido adiposo marrón.

89 - 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

95 - 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Experimentación con animales.

3.1.1 Modelos animales.

3.1.2 Dietas.

3.1.3 Genotipaje.

3.1.4 Test metabólicos in vivo.

3.1.4.1 Test de tolerancia a glucosa (GTT).

3.1.4.2 Test de tolerancia a insulina (ITT).

3.1.4.3 Test de secreción de insulina.

3.1.4.4 Obtención de plasma sanguíneo.

3.1.5 Test de exposición al frío.

3.1.6 Medida del volumen de grasa corporal mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

3.1.7 Medida del gasto energético mediante jaulas metabólicas.

3.1.8 Medida de la captación de glucosa en el BAT mediante Tomografía de emisión de positrones-Tomografía computerizada (PET/CT).

3.1.9 Experimentos de señalización de insulina *in vivo*.

3.1.10 Sacrificio de animales de experimentación.

3.2 Cultivos celulares.

3.2.1 Generación de líneas celulares de preadipocitos marrones WT y DKO.

3.2.2 Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación.

3.2.2.1 Medio y condiciones de cultivo.

3.2.2.2 Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares.

3.2.2.3 Condiciones de experimentación.

3.2.2.4 Chequeo de la existencia de Mycoplasma sp.

3.2.3 Protocolo de diferenciación.

3.2.4 Medida de la capacidad respiratoria celular mediante ensayos Seahorse®.

3.2.5 Medida del potencial de membrana mitocondrial.

3.3 Análisis de la expresión génica.

3.3.1 Aislamiento de ARN.

3.3.2 RT-PCR.

3.3.2.1 Valoración de ácidos nucleicos.

3.3.2.2 Síntesis de ADNc por retrotranscripción.

3.3.3 PCR y electroforesis en geles de agarosa.

3.3.4 PCR cuantitativa.

3.4 Análisis de la expresión de proteínas.

3.4.1 Extractos proteicos.

3.4.1.1 Obtención de extractos proteicos.

3.4.1.2 Valoración de proteínas.

3.4.2 Western blot.

3.4.2.1 Preparación de muestras para electroforesis.

3.4.2.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE.

3.4.2.3 Transferencia a membranas de PVDF.

3.4.2.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos.

3.4.2.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia.

3.4.2.6 Borrado de membranas de PVDF.

3.5 Histología y microscopía.

3.5.1 Preparación de los tejidos para las tinciones.

3.5.1.1 Fijación, inclusión en parafina y obtención de cortes.

3.5.1.2 Desparafinización e hidratación de cortes.

3.5.2 Tinción con hematoxilina y eosina.

3.5.3 Inmunofluorescencia de células en cultivo.

3.5.4 Inmunohistoquímica de BAT y tejidos adiposos.

3.5.5 Microscopía electrónica.

3.5.6 Tinción de lípidos celulares con Oil Red O.

3.6 Test metabólicos.

3.6.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

3.6.2 Metabolismo lipídico.

3.6.2.1 Ensayos colorimétricos para la medida de colesterol y triglicéridos plasmáticos.

3.6.2.2 Ensayos de lipólisis ex vivo.

3.7 Otras técnicas.

3.7.1 Cuantificación.

3.7.1.1 Cuantificación imágenes RMN.

3.7.1.3 Cuantificación blots.

3.7.1.4 Cuantificación inmunofluorescencia.

3.7.1.5 Cuantificación Oil Red O.

3.7.1.6 Cuantificación del tamaño y número de adipocitos y mitocondrias.

3.7.1.7 Cuantificación potencial de membrana mitocondrial.

- 3.7.2 Estadística.
- 3.7.3 Técnicas bioinformáticas.
- 3.7.3.1 Trabajo con imágenes.
- 3.7.3.2 Otros.

3.8 Materiales.

- 3.8.1 Agentes farmacológicos.
- 3.8.2 Listados de anticuerpos.

127 - **4. RESULTADOS.**

4.1 Importancia del receptor de IGF1 en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón y su papel en el control de la homeostasis glucídica.

- 4.1.1 Generación y caracterización del modelo BATIGFIRKO.
- 4.1.2 Papel del IGF1R en el desarrollo y en la función termogénica del BAT.
- 4.1.3 Efectos de la delección del IGF1R sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal.
- 4.1.4 Función del IGF1R en la redistribución del órgano adiposo.
- 4.1.5 Papel del IGF1R en la homeostasis glucídica y en el estatus endocrino.
- 4.1.6 Efectos de la delección del IGF1R en el BAT sobre las proteínas desacoplates de tejidos periféricos y su papel protector frente a la dieta grasa.

4.2 Efectos de la delección del IR y del IGF1R en el tejido adiposo marrón: termogénesis, marronización, mecanismos de control de calidad mitocondrial y estatus metabólico.

- 4.2.1 Generación y caracterización del modelo BATIGFIRDKO.
- 4.2.2 Efectos de la delección del IGF1R y del IR sobre el desarrollo y función termogénica del BAT y sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal.
- 4.2.3 Contribución del IGF1R y del IR sobre la mitocondriogénesis, dinámica mitocondrial y mitofagia.
- 4.2.4 Función del IGF1R y del IR en la redistribución del órgano adiposo, homeostasis glucídica y estatus endocrino.

4.3 Mitofagia y dinámica mitocondrial en preadipocitos marrones DKO.

- 4.3.1 Generación de las líneas celulares de preadipocitos marrones neonatales DKO.
- 4.3.2 Estudio de la mitofagia y la dinámica mitocondrial en preadipocitos DKO.
- 4.3.3 Papel del receptor de insulina y del de IGF1 sobre la respiración y el potencial de membrana mitocondrial.

177 - **5. DISCUSIÓN.**

197 - **6. CONCLUSIONES.**

205 - **7. BIBLIOGRAFÍA.**

225 - **8. ANEXOS.**

RESUMEN

Papel de los receptores de IGF1 e insulina en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón: regulación del balance energético.

INTRODUCCIÓN

La obesidad, enfermedad definida por un índice de masa corporal (IMC) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, es reconocida como un problema de salud pública a nivel mundial. Dada su alta prevalencia, esta enfermedad ha alcanzado proporciones epidémicas como consecuencia del aumento del consumo de alimentos hipercalóricos y el aumento del sedentarismo en las sociedades occidentales (Fuster JJ *et al.*, 2016). Tanto el peso corporal como el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo, son determinados por la interacción entre factores genéticos, ambientales y psicosociales. Estos factores influyen en última instancia en el balance energético, el cual resulta del equilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético. (Spielgeman BM & Flier JS, 2001).

El órgano adiposo en mamíferos está formado por: el tejido adiposo blanco (WAT), principal tejido encargado del almacenamiento de triglicéridos y el tejido adiposo marrón (BAT), el cual ejerce un papel esencial en el mantenimiento del gasto energético. El BAT, en respuesta al frío o tras un exceso de ingesta, va a disipar la energía en forma de calor, mediante el desacoplamiento de la respiración de la síntesis de ATP (Cannon B & Nedergaard J, 2004). En roedores, el tejido adiposo marrón permanece activo durante toda la vida. Por el contrario, en humanos, el tejido adiposo marrón tiende a desaparecer después del nacimiento, hecho que tradicionalmente hizo asumir la no existencia de tejido adiposo marrón activo en humanos adultos. Sin embargo, este concepto fue erradicado por los estudios que han demostrado la presencia de tejido adiposo marrón metabólicamente activo en humanos. Dicha evidencia, hizo considerar al tejido adiposo marrón como un posible regulador del peso corporal y del balance energético (Cypess AM *et al.*, 2009). Se han descrito multitud de factores paracrinós y endocrinos que juegan un papel importante en el desarrollo del tejido adiposo. Entre ellos, la insulina y el IGF1 tienen un papel esencial en la proliferación celular, la diferenciación y la acumulación lipídica (Boucher J *et al.*, 2012).

OBJETIVOS

Estudios previos en nuestro laboratorio, con el modelo animal *knockout* del IR específico de tejido adiposo marrón (BATIRKO), identificaron al receptor de insulina (IR) como un receptor clave en la adipogénesis del tejido adiposo marrón y en el mantenimiento de la homeostasis glucídica (Guerra C *et al*, 2001). Basándonos en la alta homología entre el receptor de insulina y el de IGF1 (IGF1R) (Belfiore A *et al*, 2009) y en los resultados previos obtenidos en preadipocitos marrones fetales carentes del IGFIR, que demostraron que dicho receptor era esencial para el desarrollo del programa adipogénico y termogénico (Mur C *et al*, 2003), nos planteamos estudiar el papel del IGF1R en el desarrollo y funcionalidad del BAT, así como el impacto de la delección del mismo sobre la marronización del tejido adiposo y el estatus metabólico. Para ello, se generaron ratones IGF1R *knockout* específicos de tejido adiposo marrón (BATIGFIRKO) y nos planteamos los siguientes objetivos: **1.** Estudiar el papel del receptor de IGF1 en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón, así como los mecanismos compensatorios llevados a cabo por el IR y los factores circulantes IGF1, BMP7 y T3. **2.** Analizar los efectos de la delección del IGF1R sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal. **3.** Establecer el impacto de la carencia del IGF1R sobre el desarrollo y distribución del órgano adiposo, la homeostasis glucídica y el estatus endocrino en el modelo BATIGFIRKO. **4.** Estudiar los efectos de la delección del IGF1R sobre las proteínas desacoplates de tejidos periféricos y su papel protector frente a la dieta grasa.

En 2012, el grupo de C.R Kahn generó el primer modelo animal sin los receptores IGF1R/IR en el órgano adiposo (FIGIRKO). Este modelo presentó una disminución considerable de la masa de tejido adiposo blan-

co y marrón, un defecto termogénico tras la exposición al frío, resistencia a la obesidad inducida por la dieta y protección frente a la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta y por la edad (Boucher J *et al*, 2012). Sin embargo, no se conoce como ambos receptores “per se” contribuyen al desarrollo del tejido adiposo marrón, a la función mitocondrial, al control de la integridad mitocondrial, a la contribución de la dinámica mitocondrial a la termogénesis marrón y al desarrollo y redistribución del órgano adiposo. Para abordar estas importantes cuestiones, se generaron los ratones IR/IGF1R doble *knockout* específicos de tejido adiposo marrón (BATIGFIRDKO) y se plantearon los siguientes objetivos: **5.** Estudiar los efectos de la delección de ambos receptores en el desarrollo y en la función termogénica del tejido adiposo marrón y su impacto sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal. **6.** Analizar cómo estos receptores contribuyen a la mitocondriogénesis, a la dinámica mitocondrial y a los procesos de mitofagia del tejido adiposo marrón y estudiar la contribución de dichos procesos a la termogénesis marrón. **7.** Estudiar el papel de estos receptores en el desarrollo y distribución del órgano adiposo, la homeostasis glucídica y el estatus endocrino en el modelo BATIGFIRDKO.

Algunos estudios han demostrado que tras la estimulación adrenérgica del BAT, los procesos de dinámica mitocondrial actúan como un regulador fisiológico de los cambios en el gasto energético (Wikstrom JD *et al*, 2014). El gran número de mitocondrias presentes en el tejido adiposo marrón (Frontini A y Cinti S, 2010), hacen de este tejido un candidato único para el estudio de los mecanismos de dinámica y de control de calidad mitocondriales, esenciales para el mantenimiento de una población de mitocondrias funcionales (Mishra P y Chan DC, 2016). Así, nos propusimos estudiar la contribución del IR y del IGF1R en dichos procesos. Para ello,

mediante la generación de líneas celulares de preadipocitos marrones IR/IGF1R DKO, nos planteamos los siguientes objetivos: **8.** Estudiar los procesos de mitofagia y dinámica mitocondrial. **9.** Estudiar como la ausencia de estos receptores afectan a la funcionalidad de los adipocitos marrones en relación a la respiración y el potencial de membrana mitocondrial.

RESULTADOS

Nuestros datos sugieren que el IGF1R no es un factor de crecimiento esencial en el desarrollo del tejido adiposo marrón en presencia de señalización de IR. Sin embargo, la ausencia de IGF1R en el BAT, se asoció a una disminución de los niveles de UCP1 y a una afectación del desarrollo de las células *beige* en el tejido adiposo inguinal. En general, el IGF1R es indispensable para el mantenimiento de una correcta función termogénica, ya que la delección de IGF1R en el BAT ocasionó una modesta disfunción termogénica. Además, la presencia de IGF1R en el tejido adiposo marrón jugó un papel en la redistribución del órgano adiposo y en la movilización lipídica, la cual afectó a la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos. Estos efectos fueron acompañados de una moderada hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina hepática debida a la acumulación de ectópica de lípidos, cambios que dieron lugar a una resistencia a la insulina global.

La delección del IR y del IGF1R de manera específica de tejido, ocasionó una severa atrofia del tejido adiposo marrón. En el tejido adiposo marrón remanente, se observó una pérdida de la proteína Porina que fue acompañado de un severo daño mitocondrial. Sin embargo, no se observó mediante microscopía electrónica la presencia de ninguna estructura autofagosómica que englobase a estas mitocondrias que presentaban severas

alteraciones de sus crestas mitocondriales. Además, se observó una disminución de varias proteínas como: UCP1, Mitofusina 2 y OPA-1 (proteínas requeridas para la fusión mitocondrial y además OPA-1 es requerida para la estructuración de las crestas mitocondriales), PINK1 y PARKINA (componentes esenciales del proceso mitofágico) en el BAT de los ratones DKO. En este sentido, se observó que tanto los preadipocitos neonatales WT como los DKO fueron capaces de inducir un correcto flujo autofágico en respuesta a la estimulación con CCCP (agente desacoplante). Sin embargo, el flujo mitofágico y el marcaje requerido para la iniciación de la mitofagia se encontraron específicamente afectados en las células DKO. También se encontró que los animales DKO presentaron un severo defecto en los mecanismos de fisión mitocondrial en respuesta al frío, los cuales, en parte fueron los responsables del severo fallo termogénico en respuesta al frío y de la mayor susceptibilidad a la obesidad, visualizada por el aumento de la masa grasa corporal, así como del desencadenamiento de una resistencia a la acción de la insulina. Bajo situación de exceso energético, los animales DKO presentaron una inhibición de los procesos de fisión mitocondrial. Estos cambios junto con la atrofia del tejido adiposo marrón observada contribuyeron al desarrollo de obesidad, al desencadenamiento de la resistencia a la insulina asociada a la hiperinsulinemia y a un severo aumento de los triglicéridos. En conjunto, el defecto en los mecanismos de fisión y la pérdida de UCP1 en el tejido adiposo marrón atrofiado fueron los responsables de la disminución del gasto energético y del severo fallo termogénico observados, que en conjunto pueden explicar el aumento de la grasa corporal, la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la no alteración de la tolerancia a la glucosa observada en los ratones DKO en comparación con los ratones control.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. El IGF1R no es esencial para el desarrollo del tejido adiposo marrón en presencia de la señalización de insulina y elevados niveles de IGF1 circulantes.
2. La presencia de IGF1R en el BAT juega un papel importante en el mantenimiento de la termogénesis y en la marronización del tejido adiposo inguinal.
3. La moderada disfunción termogénica observada en el modelo animal BATIGFIRKO es suficiente para ocasionar una redistribución del órgano adiposo que va a facilitar el depósito ectópico de lípidos.
4. La ausencia de IGF1R en el BAT es capaz de ocasionar alteraciones en la homeostasis glucídica y regular los niveles de proteínas desacoplantes en los tejidos periféricos.
5. El aumento de UCP3 en el músculo cardíaco del modelo animal BATIGFIRKO ejerce un papel protector frente a la resistencia a la insulina inducida por la dieta grasa no obesogénica.
6. Los receptores de IGF1 e insulina son imprescindibles para el desarrollo y la funcionalidad del tejido adiposo marrón. Su ausencia, se asocia con el aumento compensatorio de la marronización del tejido adiposo inguinal.
7. La severa disfunción termogénica observada en el modelo animal DKO es asociada a una menor cantidad y actividad de la proteína UCP1, así como a un fracaso de la fisión mitocondrial en respuesta al frío.
8. La ausencia de IGF1R e IR en el BAT, se asocia a alteraciones en el número, tamaño y morfología de las mitocondrias, las cuales no van a poder ser correctamente eliminadas debido a un defecto en la iniciación de la mitofagia mediada por p62.

9. La delección de IGF1R e IR en el BAT, es capaz de ocasionar alteraciones en la homeostasis glucídica y está asociada a una mayor susceptibilidad a la obesidad, la cual tras la dieta grasa dio lugar a una manifiesta obesidad.

Conclusión final: Los receptores de IGF1 e insulina son esenciales para el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón, jugando un papel fundamental en la mitocondriogénesis, en el control de calidad mitocondrial y en los procesos de dinámica mitocondrial requeridos para la activación del tejido adiposo marrón en respuesta al frío.

SUMMARY

Role of IGF1 and insulin receptors in the development and function of brown adipose tissue: energy balance regulation.

INTRODUCTION

The prevalence of obesity, defined as a body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², is now recognized worldwide as a major health problem, reaching epidemic proportions probably as a consequence of changes in food composition and exacerbated by sedentary lifestyle in Western societies (Fuster JJ *et al.*, 2016). Indeed, food behavior and body weight are determined by the influence of several genetic, environmental, and psychosocial factors. Ultimately, the imbalance between food energy intake and energy expenditure resulted in a prominent fat storage in the adipose organ (Spielgeman BM & Flier JS, 2001).

The adipose organ includes two functional and morphologically different types of adipose tissue in mammals: white adipose

tissue (WAT), which is the primary site of dynamics triglyceride storage and brown adipose tissue (BAT), an essential component of the adaptive thermogenesis triggered by dissipating energy as heat through uncoupled respiration mediated by uncoupling protein 1 (UCP1) in response to cold or overfeeding (Cannon B & Nedergaard J, 2004). In rodents, brown fat remains active for life. However, in humans largely disappears shortly after birth, and thus it has traditionally assuming that there is no functional brown fat present in adult humans. However, this concept has been radically revised by which have identified active brown fat in human studies, suggesting a critical role of brown fat in human adult energy metabolism and body weight control (Cypess AM *et al.*, 2009). Many paracrine and endocrine factors control adipose tissue development. Among them, insulin and IGF1 play an essential role in stimulating cell proliferation, differentiation and lipid accumulation in the adipose tissue (Boucher J *et al.*, 2012).

OBJECTIVES

Previous work in our lab with the brown adipose tissue-specific insulin receptor *knockout* (BATIRKO) animal model, showed that insulin receptor (IR) is essential for

the brown fat adipogenesis and glucose homeostasis. Due to the higher homology between insulin and IGF1 receptors (IGF1R) (Belfiore A *et al*, 2009) and the results in our lab with IGF1R-deficient brown preadipocytes, that showed an important role of IGF1R in the adipogenic and thermogenic-programs (Mur C *et al*, 2003), we decided to study the role of IGF1R in the development and functionality of BAT and also the effects of this deletion in white adipose tissue *being* and metabolic status. For this purpose, we set ourselves the following objectives by the generation of IGF1R BAT-specific *knockout* mice (BATIGFIRKO): **1.** Study the role of IGF1R in the development and function of BAT, as well as potential compensatory mechanisms performed by the IR and circulating factors IGF1, BMP7 and T3. **2.** Analyze the IGF1R deletion effect on inguinal and epididymal white adipose tissue *being* process. **3.** Establish the impact of IGF1R deficiency on the development and distribution of adipose organ, glucose homeostasis and endocrine status in BATIGFIRKO model. **4.** Study the IGF1R deletion effect on the expression of uncoupling proteins in peripheral tissues and its potential protective role against high fat diet.

In 2012, Kahn's lab generated the first IGF1R/IR adipose organ-specific double *knockout* mice (FIGIRKO). These mice had markedly decreased white and brown fat mass, were completely resistant to high fat diet-induced obesity and age- and high fat diet-induced glucose intolerance and were unable to maintain body temperature when placed at 4 °C (Boucher J *et al*, 2012). However, remained unrecognized how both receptors may contribute to brown fat development, mitochondrial quality control, mitochondrial dynamics and its contribution to brown fat thermogenesis and finally, its impact on the formation and redistribution

of the adipose organ. To address those important issues, we have developed the IR/IGFIR brown adipose tissue-specific double *knockout* mice (BATIGFIRDKO) and set ourselves the following objectives: **5.** Study the effects of the deletion of both receptors in the development and thermogenic function of BAT and its impact on inguinal and epididymal adipose tissue *being*. **6.** Analyze the contribution of this receptors to mitochondriogenesis, mitochondrial dynamics and mitophagy in BAT and study the contributions of these processes to brown fat thermogenesis. **7.** Study the role of this receptors in the development and distribution of adipose organ, glucose homeostasis and endocrine status in BATIGFIRDKO model.

Some studies indicates that adrenergically-induced changes to mitochondrial dynamics are required for BAT thermogenic activation and for the control of energy expenditure (Wikstrom JD *et al*, 2014). The large number of mitochondria presents in BAT (Frontini A y Cinti S, 2010) make this tissue a perfect candidate for the study of quality control and mitochondrial dynamics processes that are essentials for the maintenance of a functional mitochondrial population (Mishra P y Chan DC, 2016). Therefore, we proposed to study the contribution of IR and IGF1R in these processes. For this purpose, we generated IGF1R/IR DKO brown preadipocytes cell lines and pursued the following objectives: **8.** Study mitophagy and mitochondrial dynamics. **9.** Study how the absence of this receptors can affect to brown preadipocytes functionality in relation to respiration and mitochondrial membrane potential.

RESULTS

Our data suggest that IGF1R it is not an essential growth factor in the brown fat development in the presence of the IR.

However, the lack of IGF1R decreased the UCP1 expression in iBAT and much affect the development of the *beige* cells bearing UCP1 protein expression mostly in the inguinal white fat depots. Overall, IGF1R it is indispensable to maintain the full thermogenic capacity, the lack of IGF1R resulting in an impaired cold acclimation. In addition, brown fat driven by IGF1R plays an unrecognized role in the redistribution of the adipose organ and lipid mobilization that affect the insulin sensitivity in peripheral tissues as revealed by sustained moderate hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, hepatic insulin sensitivity being much impaired associated with lipid accumulation, with the outcome of a global insulin resistance.

The lack of IR/IGF1R in a conditional manner gave rise to a severe brown fat atrophy. In the remnant tissue, a loss in the expression of Porin (VDAC1, Voltage-dependent anion-selective channel protein 1) in parallel to a severe mitochondrial damage without the presence of autophagosomes, a loss in the UCP1 protein expression that induces uncoupling, a loss in the expression of Mitofusin-2 or Opa-1 (optic atrophy protein 1), both required for fusion-competent mitochondria and a loss in the expression of Pink-1 (PTEN-induced putative kinase protein 1) or Parkin, essential components of the mitochondrial labelling for mitophagy initiation was observed in DKO mice. On this regard, DKO and control neonatal preadipocytes were able to induce the autophagic flux in response to the oxidative stressor CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazone). However, the mitophagic flux or the initial mitochondrial labelling for mitophagy initiation was impaired in DKO versus control cells. More importantly, the mitochondrial fission mechanism in response to cold acclimation was impaired. As a result, DKO mice showed

a thermogenic failure in response to a cold environment, a sporadic enhancement of body fat mass and global insulin resistance. Under excess nutrient environment (high fat diet), they showed an inhibition of the mitochondrial fission mechanism in response to fatty acids input. Together the impaired fission mechanism and the loss of the UCP1 in the context of a severe brown fat atrophy may contribute to the reduction of the energy sink and a failure in the thermogenic mechanism that may account for the increased body weight and fat mass, a sustained insulin resistance and hyperinsulinemia, without glucose intolerance, observed in those DKO versus control mice.

CONCLUSIONS

As a result, we reached the following conclusions:

1. IGF1R is not essential for the development of brown adipose tissue in the presence of a functional insulin signaling and higher IGF1 plasma levels.
2. The presence of IGF1R in BAT plays an important role in the thermogenesis maintenance and in the *beiging* process occurred in inguinal white adipose tissue.
3. The mild impaired thermogenesis observed in BATIGFIRKO upon cold exposure may account for the adipose organ redistribution that causes lipid mobilization and ectopic deposit of lipids.
4. The absence of IGF1R in BAT, produces changes in glucose homeostasis and regulates the uncoupling protein levels in peripheral tissues.
5. The UCP3 increases in heart muscle in BATIGFIRKO animal model, plays a protective role against non-obesogenic high fat diet-induced insulin resistance.

6. IGF1 and insulin receptors are essentials for the development and functionality of brown adipose tissue and its absence is associated with a compensatory increase of *beiging* in inguinal white adipose tissue.

7. The severe thermogenic failure observed in DKO animal model is associated with lower quantity and activity of UCP1 protein, as well as a mitochondrial fission failure upon cold exposure.

8. The lack of IGF1R and IR in BAT, is associated with alterations in the number, size and mitochondrial morphology, which can't be correctly eliminated due to an impairment in p62-mitophagic initiation.

9. IGF1R and IR deletions in BAT, produces alterations in glucose homeostasis and is associated with a higher obesity susceptibility, which after high fat diet led to a manifest obesity.

Final conclusion: IGF1 and insulin receptors are essentials for the development and function of brown adipose tissue, playing an important role in the mitochondriogenesis, mitochondrial quality control and in the mitochondrial dynamic processes requires for brown fat thermogenesis.

ABREVIATURAS

Acetil-CoA , Acetil-Coenzima A	CCCP , Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
ADN , Ácido desoxirribonucleico	CDCA , Ácido quenodesoxicólico
Akt , Proteína kinasa B	CHE , Colesterol esterasa
AMPC , Adenosin monofosfato cíclico	CHOD , Colesterol oxidasa
AMPK , Proteína quinasa activada por AMP	CPTI-M , Isoforma M de la carnitil palmitoil transferasa 1
ANP , Péptido natriurético atrial	CPTII , Carnitil palmitoil transferasa 2
aP2 , Proteína de adipocitos 2	DAP , dihidroxiacetona fosfato
ApoB , Apolipoproteína B	DIO2 , desyodasa tipo 2
ARN , Ácido ribonucleico	ELISA , Ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzimas
ARNm , ARN mensajero	ET-1 , endotelina 1
Atf-2 , Factor activador de la transcripción 2	Fabp4 , Proteína de unión a ácidos grasos 4
Atg , Proteínas relacionadas con la autofagia	FADH , Flavín adenín dinucleótido
ATP , Adenosin trifosfato	FAS , Ácido graso sintasa
4-AF , 4-aminofenazona	FCCP , Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
BAD , agonista de muerte celular asociado a Bcl2	FGF21 , Factor de crecimiento fibroblástico 21
Bcl2 , Proteína de leucemia de célula B 2	FIP200 , Familia de quinasas FAK que interactúan con proteínas de 200 kDa
Bclx , Proteína 1 similar a Bcl2	FNDC5 , Proteína 5 con dominios de fibronectina de tipo III
BMPs , Factores morfogénicos óseos	FoxO1 , proteína O1 de la familia Forkhead con dominios tipo caja
Bnip3 , Proteína 3 de interacción con Bcl2 y proteínas de adenovirus E1B de 19 kDa	Gab1 , Proteína de unión asociada a Grb2
BNP , Péptido natriurético cerebral	G3P , Glicerol 3 fosfato
C/EBPα , Proteína α de unión al potenciador CCAAT	
CB1 , Receptor de cannabinoides 1	

GK, Glicerol quinasa

GLUT4, Transportador de glucosa 4

GPO, Glicerol-3-oxidasa

Grb2, Proteína de unión a receptores de crecimiento 2

GS, Glucógeno sintasa

GSK3 β , Glucógeno sintasa quinasa 3 β

HFD, Dieta rica en grasas

HIF-1 α , Factor inducible por hipoxia 1 α

ICC, Índice cintura-cadera

IGF-1, Factor de crecimiento insulínico de tipo 1

IGFIIR, Receptor de IGFII

IL-1, Interleuquina 1

IL-6, Interleuquina 6

IMC, Índice de masa corporal

IR-A, Isoforma A del receptor de insulina

IR-B, Isoforma B del receptor de insulina

IR, Receptor de insulina

IRS1, Sustrato del receptor de insulina 1

JNK, Quinasa N-terminal c-Jun

LC3, Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1

LPL, Lipoproteína lipasa

MAPK, Proteína quinasa inducida por mitógenos

MED-1, Proteína mediadora de la transcripción de la subunidad 1 de la ARN polimerasa

MSC, Células madre mesenquimales

mTORC2, Complejo diana de la rapamicina en mamíferos 2

Myf5, Factor miogénico 5

NA, noradrenalina

NAD, Nicotín adenín dinucleótido

NADH, Nicotín adenín dinucleótido

NEFA, Ácidos grasos no esterificados

NF κ B, Factor nuclear kappa B

NO, Óxido nítrico

NPs, Péptidos natriuréticos

OMS, Organización Mundial de la Salud

p62, secuestrosoma 1

p70S6K, Proteína quinasa S6 ribosomal de 70 kDa

PARL, Proteína romboide asociada a prenilina

PDK1, Proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositidos

PE, Fosfatidiletanolamina

PET, tomografía de emisión de positrones

PGC1- α , Coactivador 1 alfa del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas

PI3K, Fostatidilinositol 3 quinasa

PINK1, Quinasa inducida por PTEN 1

PKA , Proteína quinasa A	TNF-α , Factor de necrosis tumoral alfa
PKC , Proteína quinasa C	TSC2 , Complejo de esclerosis tuberosa 2
PKG , Proteína quinasa G	UCP1 , proteína desacoplante 1
POD , Peroxidasa	ULK1 , Quinasa 1 similar a UNC51
PPARγ , Activador de la proliferación de peroxisomas γ	VCAM-1 , Molécula de adhesión de células vasculares 1
PTEN , Fosfatidilinositol-3,4,5,- trifosfato fosfatasa 3	VDAC , canal de aniones dependiente de voltaje
RBP4 , Proteína de unión a retinol 4	VEGF-A , Factor de crecimiento endotelial A
ROS , Especies reactivas de oxígeno	VLDL , Lipoproteínas de muy baja densidad
Shc , Proteína con dominio de homología Src 2	WAT , Tejido adiposo blanco
SHIP2 , Inositol fosfatasa con dominios SH2	
Sirt 2 , Sirtuina 2	
SNC , Sistema nervioso central	
SNS , Sistema nervioso simpático	
SREBP-1c , Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c	
T3 , Triiodotironina	
Tbx1 , Factor de transcripción “caja T”	
TG , Triglicéridos	
TGF-β , Factores de crecimiento transformantes β	
TGR5 , Receptor acoplado a proteínas G	
TLR , receptores de tipo <i>Toll</i>	
Tmem26 , Proteína transmembrana 26	

INTRODUCCIÓN

1.1 OBESIDAD Y COMPLICACIONES ASOCIADAS.

1.1.1 La obesidad en la actualidad.

La obesidad, es una enfermedad crónica caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal. Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública de primer orden ya que afecta a personas de todas las edades y su prevalencia ha ido en aumento tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (Ng M *et al.*, 2014).

Según los últimos datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año mueren aproximadamente 2,8 millones de personas a causa de la obesidad o el sobrepeso, por lo que la obesidad ha sido considerada como una de las epidemias del siglo XXI. En 2014, más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 600 millones eran obesos. En 2014 alrededor del 13% de la población adulta mundial (11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos. Además, el 39% de los adultos (un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso (WHO, 2000).

La etiología de la obesidad es compleja y multifactorial, siendo los factores genéticos,

medioambientales y socioeconómicos los principales implicados.

En las últimas décadas, debido a los cambios en el estilo de vida experimentados en las sociedades occidentales, se ha observado un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos el cual ha ido acompañado de un aumento del sedentarismo como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento y de una creciente urbanización (Hruby A *et al.*, 2016).

De manera paralela, en numerosos países en desarrollo está creciendo de manera alarmante el número de personas que sufren obesidad, en particular en los entornos urbanos. Este hecho coexiste con la prevalencia de la desnutrición y enfermedades infecciosas que afectan al sector más pobre de la población. El bajo coste de los productos con alto aporte calórico y con bajo aporte nutricional ha permitido que en los últimos años coexistan la desnutrición y la obesidad dentro de una misma región (Popkin B.M *et al.*, 2012).

Uno de los grandes problemas asociados a la obesidad, es que esta patología tiene consecuencias a nivel sistémico afectando a gran cantidad de tejidos y ocasionando otras pa-

tologías asociadas como: hipertensión, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, dislipidemia, cáncer, apnea, esteatosis hepática, ovario poliquístico, etc. (Maffort T.T *et al.*, 2016). Debido a las numerosas complicaciones asociadas a esta enfermedad, las autoridades sanitarias continúan en sus esfuerzos por implementar planes de acción en los cuales tanto los cambios en los hábitos alimenticios como el aumento de la actividad física diaria son las principales medidas para tratar de reducir los índices de sobrepeso y obesidad. Por todo ello, es de vital importancia profundizar en el estudio de esta enfermedad, así como en tratamientos farmacológicos que puedan ser de fácil acceso a toda la población.

1.1.2 Concepto y clasificación de la obesidad.

En la obesidad, la masa de tejido adiposo puede llegar a alcanzar desde el 30% hasta >50% de la masa corporal total. Según la OMS, se considera que una persona sufre obesidad cuando su índice de masa corporal (IMC) es superior a 30 Kg/m². El índice de masa corporal viene dado por la siguiente ecuación:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$$

Según este parámetro podemos definir distintos grados de obesidad:

Clasificación	IMC (Kg/m ²)
Bajo peso	<18,5
Normal	18,5-24,9
Sobrepeso:	≥25
Pre-obeso	25-29,9
Obesidad grado I	30-34,9
Obesidad grado II	35-39,9
Obesidad grado III	≥40

Tabla 1.1 Clasificación de la OMS del estado nutricional según IMC.

Es importante tener en cuenta que el IMC no diferencia entre individuos cuyo mayor peso se debe a un aumento de masa muscular o a un aumento de grasa corporal. Como resultado, es difícil establecer una correlación entre el IMC y la cantidad de grasa de un individuo. Por este motivo, existen otros parámetros de gran utilidad a la hora de solventar este problema, puesto que al contrario del IMC, nos dan un reflejo de la cantidad de grasa que posee el individuo:

- **Índice cintura-cadera (ICC):** es una medida antropométrica para medir los niveles de grasa intraabdominal. Este índice resulta de dividir el perímetro de la cintura entre el perímetro de la cadera:

$$\text{ICC} = \text{cintura (cm)} / \text{cadera (cm)}$$

La OMS establece que un ICC > 1 en hombres o > 0,85 en mujeres es indicativo de acumulación de grasa abdominal el cual se asocia con un mayor riesgo de padecer síndrome metabólico.

- **Circunferencia de la cintura:** al igual que el ICC, se ha comprobado que esta medida por sí misma también puede ser utilizada para medir los niveles de grasa intraabdominal (Tabla 1.2). Además, cambios en la circunferencia de la cintura han sido asociados con el riesgo cardiovascular (Report of WHO consultation, 2000; Fuster JJ *et al.*, 2016).

Riesgo complicaciones metabólicas	Circunferencia de la cintura (cm)	
	Hombres	Mujeres
Incrementado	≥94	≥80
Alto	≥102	≥88

Tabla 1.2. Circunferencia de la cintura (cm) según el sexo y riesgo de complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad en poblaciones caucásicas.

Basándonos en la localización del tejido adiposo blanco, podemos diferenciar dos tipos de obesidad:

- **Obesidad androide:** en este tipo de obe-

sidad el tejido adiposo se localiza principalmente en la zona abdominal o intraabdominal (Figura 1.1 izquierda). Se asocia con una fisionomía comúnmente llamada tipo manzana y está asociada a un mayor riesgo de sufrir síndrome metabólico

- **Obesidad ginecoide:** caracterizada por una acumulación de tejido adiposo subcutáneo principalmente en caderas, muslos y glúteos (Figura 1.1 derecha). También es asociada con un fenotipo de pera y al contrario que la obesidad androide, se considera que no va asociada a efectos metabólicos adversos. (Krotkiewski M *et al.*, 1983; Rezaee F y Dashty M, 2013).

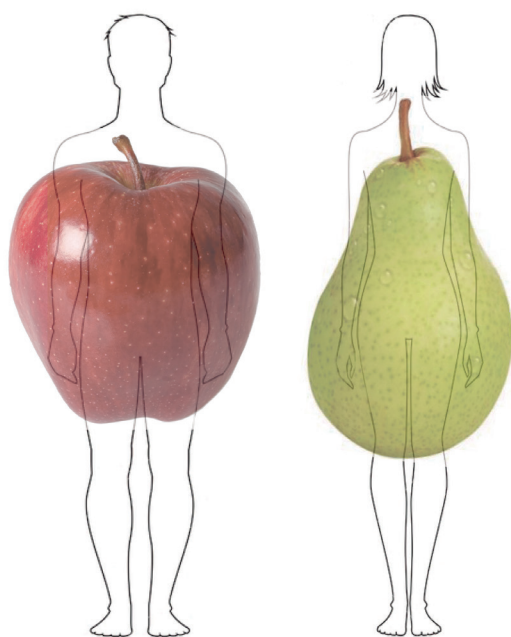


Figura 1.1. Representación gráfica donde se refleja el fenotipo manzana y el fenotipo pera en relación a la distribución de la grasa corporal.

1.1.3 Fisiopatología de la obesidad.

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio del balance energético, donde las calorías ingeridas sobrepasan en gran medida a las calorías consumidas, dando como resultado un acumulo de las mismas en forma de grasa. Según la primera ley de la termodinámica, la energía

ni se crea ni se destruye, se transforma (Hall KD *et al.*, 2012). Siguiendo esta ley, el balance energético puede definirse como:

$\text{Balance energético} = \text{Ingesta calórica} - \text{Gasto energético}$ (Figura 1.2).

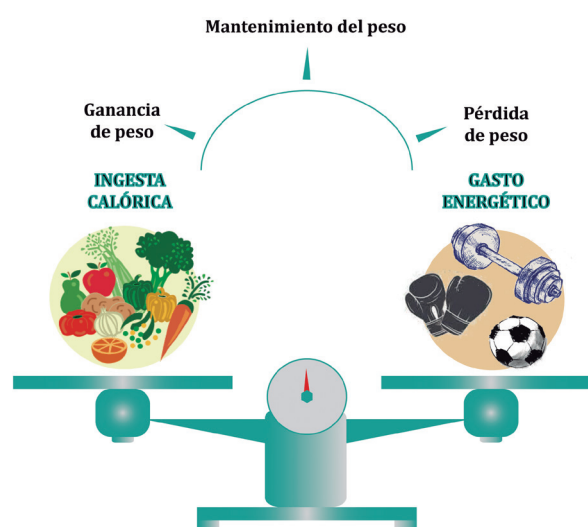


Figura 1.2. Esquema que representa las posibles variaciones del balance energético en función de la ingesta calórica y el gasto energético.

La energía que ingerimos por parte de los alimentos deriva de las proteínas, los hidratos de carbono y las grasas, las cuales nos aportan alrededor de 4 kcal/g (proteínas e hidratos de carbono) y 9 Kcal/g (grasas). Por otro lado, la energía gastada, resulta del sumatorio de:

- **Tasa metabólica basal:** energía necesaria para mantener los procesos biológicos de un individuo en estado basal cuando no se está realizando la digestión y el individuo se encuentra en termoneutralidad. Supone entre el 60-70% del gasto energético total de un individuo y se encuentra principalmente regulado por las hormonas tiroideas.

- **Termogénesis adaptativa:** energía disipada en forma de calor como resultado de una exposición al frío y/o a la dieta. (Spielgean BM y Flier JS, 2001) (Hill JO *et al.*, 2012).

Tiene lugar en el tejido adiposo marrón y en el músculo. Puede ser dividida en tres subtipos: la termogénesis con tiriteo tras exposición a frío la cual es función del músculo esquelético y la termogénesis sin tiriteo tras exposición a frío o la inducida por la dieta que tienen lugar en el tejido adiposo marrón.

- **Actividad física:** energía producida como resultado de la realización de cualquier tipo de actividad física.

- **Efecto térmico de los alimentos:** es el calor producido como consecuencia de la digestión, absorción, procesamiento y almacenamiento de la energía procedente de los alimentos. Tiene lugar en el estómago, intestino, hígado y tejido adiposo blanco. (Tseng YH *et al.*, 2010).

Las alteraciones en el control del balance energético se traducen en una alteración de los principales procesos que regulan el metabolismo lipídico: la lipogénesis y la lipólisis.

Durante un periodo donde un individuo aumenta la ingesta o disminuye el gasto energético, el exceso de energía es almacenado en el tejido adiposo en forma de triglicéridos (lipogénesis). Sin embargo, en épocas de ayuno o aumento del gasto energético, la reserva de lípidos se libera mediante lipasas al torrente sanguíneo para ser transportados al hígado, músculo y tejido adiposo marrón donde son utilizados en la oxidación de los ácidos grasos para obtención de energía (lipólisis).

El tejido adiposo es el mayor reservorio de energía del cuerpo humano. El adipocito almacena esta energía en forma de triglicéridos (TG), los cuales pueden proceder de la lipogénesis *de novo* o a partir de los lípidos de la dieta.

Los lípidos procedentes de la dieta o los sintetizados a partir de un exceso de carbohi-

dratos de la dieta, son transportados al tejido adiposo como quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). De esta manera, ambas partículas son capaces de activar a la lipoproteína lipasa (LPL) localizada en la cara interna de las células endoteliales del tejido adiposo y muscular. Esta enzima degrada los triglicéridos presentes en ambas partículas dando lugar a ácidos grasos no esterificados (NEFA) y monoglicéridos (Calderón-Domínguez M *et al.*, 2015). Los NEFA pueden ser transportados por el torrente circulatorio hasta el tejido adiposo donde serán esterificados para formar TG y así evitar su toxicidad (Lafontan M y Langin D, 2009).

En condiciones de sobrealimentación, en primer lugar, el acúmulo del exceso de energía en forma de lípidos va a hacer que el tejido adiposo aumente el tamaño de sus células (hipertrofia) hasta llegar al umbral ($\sim 0,7-0,8 \mu\text{g/célula}$). Tras este paso, tiene lugar la liberación de señales por los adipocitos que van a inducir la proliferación y/o diferenciación de los preadipocitos presentes en el tejido (hiperplasia). Por esta razón, una vez que ha aumentado el número de adipocitos es difícil poder eliminarlos, de tal forma que una pérdida de peso siempre irá acompañada con una reducción del tamaño, pero no del número de los adipocitos. Además, ha de tenerse en cuenta, que el número de adipocitos se fija en la infancia y la adolescencia. Este hecho, tiene especial relevancia sobre todo en la obesidad infantil donde el proceso hiperplásico es predominante siendo el tratamiento de los mismos más complicado que en el caso de los adultos donde el proceso hipertrófico es el predominante. (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014).

Además de los mediadores proinflamatorios liberados por los propios adipocitos en respuesta a su hipertrofia, los ácidos grasos saturados, son capaces de unirse a los receptores de tipo Toll (TLR) 2 y 4 presentes en los

adipocitos y en los macrófagos que residen en el propio tejido adiposo. La activación de dichos receptores va a permitir una proliferación de macrófagos de tipo M1 los cuales se caracterizan por la producción de citoquinas proinflamatorias como son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 1 (IL-1) e interleuquina 6 (IL-6). Este ambiente proinflamatorio va a alterar la producción de otras adipoquinas por parte del tejido adiposo que pueden ser las responsables del desarrollo de resistencia a la insulina. (Oh DY *et al.*, 2012; Rezaee F y Dashty M, 2013; Fuster JJ *et al.*, 2016). El mayor reclutamiento de macrófagos M1 al tejido también puede estar ocasionado por un aumento en la apoptosis de los adipocitos como consecuencia del fenómeno de hipertrofia, de tal manera que el debris lipídico puede ser lipotóxico para los macrófagos promoviendo así la inflamación y la polarización a tipo M1 (Hill AA *et al.*, 2014).

Por otra parte, la hipertrofia de los adipocitos va ocasionar una reducción de la capilarización del tejido, disminuyendo así el flujo de nutrientes y de oxígeno. Este hecho va a contribuir a la disfunción de dichos adi-

pocitos, así como a la aparición de un estado de resistencia a la insulina. Estudios con ratones donde se sobre expresa el factor de crecimiento endotelial A (VEGF-A) en los adipocitos mostraron un aumento de la angiogénesis en el tejido, hecho que consiguió atenuar algunos efectos metabólicos de la obesidad inducida por la dieta, tales como la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática. (Elias I *et al.*, 2012). Diversos estudios han demostrado un aumento de los niveles del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) en pacientes obesos. Este factor suprime la β oxidación por represión transcripcional de la sirtuina 2 (Sirt 2), la cual deacetila al coactivador 1 α del receptor y activado de proliferación de peroxisomas (PGC1- α), disminuye los niveles de adiponectina y promueve la fibrosis y la inflamación del tejido (Krishnan J *et al.*, 2012). En relación a la fibrosis, es un factor importante a tener en cuenta, ya que una matriz fibrótica va a limitar la expansión de los adipocitos en respuesta al exceso de nutrientes (Figura 1.3), contribuyendo así junto con el resto de alteraciones a la inflamación y al depósito de lípidos en otros tejidos (Sun K *et al.*, 2013).

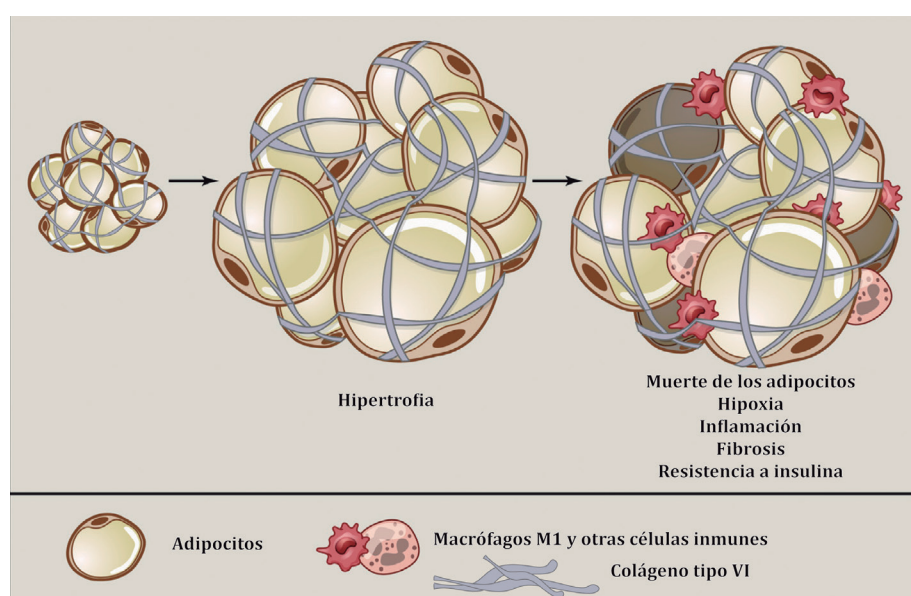


Figura 1.3. Evolución del proceso fibrótico en el tejido adiposo blanco. Adaptación de Rosen ED y Spiegelman BM, 2014

La inflamación local impide la diferenciación de los preadipocitos, reduce el almacenamiento lipídico favoreciendo los procesos lipolíticos y altera la producción de citoquinas como adiponectina y leptina. Por todo ello, se va a favorecer el aumento de la acumulación ectópica de lípidos principalmente en músculo e hígado. Estos órganos son los principales consumidores de glucosa del cuerpo, por ello la acumulación de lípidos en los mismos y su consecuente disfunción va a contribuir al desarrollo del síndrome metabólico. (Rezaee F y Dashty M, 2013).

1.1.4 Complicaciones asociadas: síndrome metabólico.

El síndrome metabólico o síndrome X, se define como un conjunto de patologías que comúnmente suelen manifestarse de manera conjunta en determinados individuos. Este síndrome incluye las siguientes patologías: obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión.

La prevalencia del síndrome metabólico en Europa, Asia, Australia y América se encuentra entre el 13,4% y el 70% siguiendo la definición de la OMS y entre 7,4% y el 50% siguiendo la definición de la Federación Internacional de Diabetes. (Kastorini CM *et al.*, 2011)

1.1.4.1 Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

La consecuencia metabólica más conocida de la obesidad es la resistencia a la insulina. Esta se manifiesta con hiperinsulinemia, hiperglucemia y dislipidemia. En la resistencia a la insulina sistémica va a tener lugar una lipólisis del tejido adiposo no controlada dando lugar al depósito ectópico de lípidos en distintos tejidos, el cual será el causante del desarrollo del síndrome metabólico (Rutkowski JM *et al.*, 2015).

En la diabetes tipo 2, el evento inicial que lleva al desarrollo de la enfermedad, es la resistencia a la insulina. La fase de resistencia a la insulina, denominada pre-diabetes, puede alargarse durante años o incluso nunca evolucionar hacia la diabetes. Este hecho es posible gracias a la compensación por parte del páncreas, que eleva los niveles de insulina para hacer frente a la falta de acción de la hormona en los tejidos. (Bartolomé A, 2012).

Existen tres hipótesis que intentan explicar el origen de la resistencia a la insulina:

- **La hipótesis de la expansibilidad limitada del tejido adiposo:** los adipocitos tienen un límite de expansibilidad, de tal forma que, si el exceso de energía se mantiene a lo largo del tiempo, se inducirá el proceso de lipólisis en el tejido adiposo blanco de forma que habrá una liberación masiva de ácidos grasos que irán a distintos tejidos periféricos (hígado, músculo, corazón o páncreas) donde se depositarán ectópicamente y serán los responsables de distintos efectos lipotóxicos, así como de una resistencia insulínica en los mismos (Rezaee F y Dashty M, 2013). El aumento de ácidos grasos libres circulantes, van a deteriorar la capacidad de la insulina de suprimir la liberación de glucosa hepática y de estimular la captación de glucosa por el músculo, así como, van a inhibir la secreción de insulina por parte de la célula β (Figura 1.4) (Kahn BB y Flier JS, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que no existe una correlación entre la cantidad de tejido adiposo y la diabetes, ya que existen individuos delgados que pueden desarrollar resistencia a la insulina e individuos obesos que no la desarrollan (Sims EA, 2001). En este sentido, la OMS ha tenido que revisar la definición de síndrome metabólico para las poblaciones asiáticas, ya que se ha observado, que las complicaciones metabólicas ocurren a unos rangos inferiores de IMC en comparación con poblaciones caucásicas (Virtue S y Vidal-Puig A, 2010).

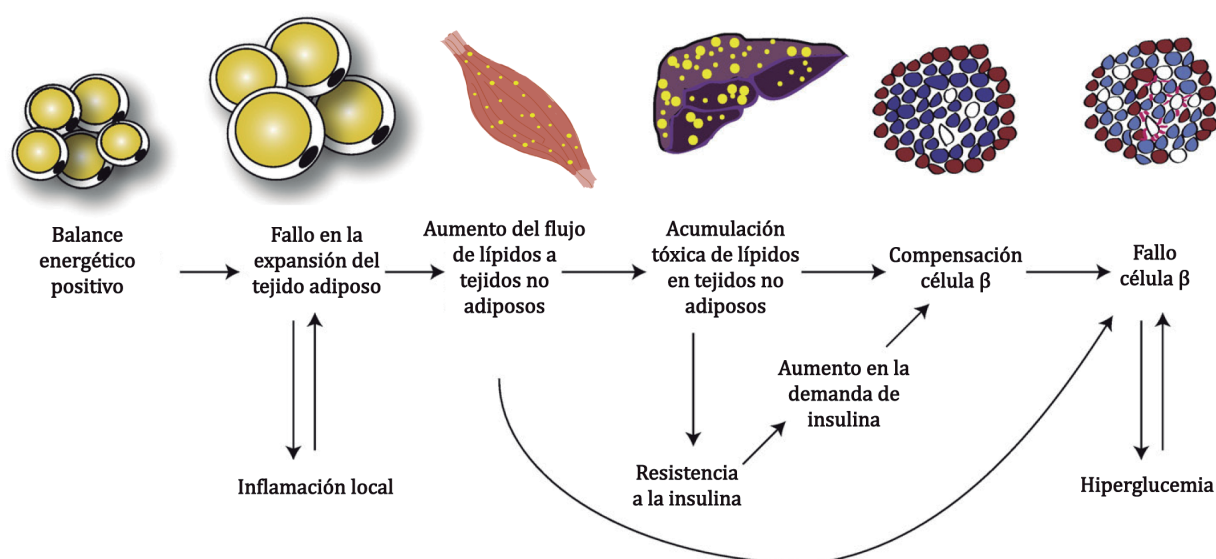


Figura 1.4. Esquema donde se reflejan los acontecimientos que tienen lugar en la hipótesis de la expansibilidad del tejido adiposo. Adaptación de Virtue S y Vidal-Puig, 2010.

- **La hipótesis de la alteración de las adipocinas:** esta hipótesis se centra en el papel endocrino del tejido adiposo. Como hemos mencionado previamente, en la obesidad el exceso de calorías se almacena en los adipocitos dando lugar a su hipertrofia. Dicha hipertrofia, va a ocasionar distintas alteraciones en el adipocito, entre las cuales se encuentra la alteración en la secreción de distintas adipocinas.

Entre las principales adipocinas que van a ser afectadas durante la obesidad se encuentran: leptina, adiponectina y resistina.

- **Leptina:** principalmente es liberada por el tejido adiposo blanco, aunque también puede ser secretada por la placenta, los ovarios, el tejido adiposo marrón, el músculo esquelético, el hígado, la médula ósea, la pituitaria, el epitelio mamario y las glándulas del estómago. Esta adipocina media la sensación de saciedad tras la ingesta de alimento a través de sus receptores localizados en el hipotálamo. (Braun S *et al.*, 2011). Los niveles de leptina circulantes son proporcionales a la cantidad de masa grasa. (Tchernof A y Després JP, 2013). La leptina tiene un

efecto lipolítico en el tejido adiposo el cual es mediado por el sistema nervioso autónomo (Ruud J y Brüning JC, 2015), mientras que en el músculo esquelético y en la célula β promueve la oxidación de lípidos e inhibe la síntesis lipídica (Kahn BB y Flier JS, 2000). En la obesidad se produce un aumento en los niveles de leptina circulantes, que en el caso de humanos y modelos animales no va acompañado con una supresión del apetito lo cual nos sugiere que la resistencia a la leptina es un fenómeno común en la obesidad (Blüher M y Mantzoros CS, 2015). Este hecho puede deberse al ambiente inflamatorio instaurado en el tejido adiposo o al efecto de los TG en la ruta de señalización de la leptina. La leptina a su vez induce el estrés oxidativo, inflamación vascular, hipertrofia de las células del músculo liso vascular e influye en el sistema nervioso simpático contribuyendo de esta forma al desarrollo de la hipertensión y la enfermedad cardiovascular (Fuster JJ *et al.*, 2016).

- **Adiponectina:** es una adipocina muy abundante en el plasma (3-30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en humanos) que actúa mejorando la sensibilidad a la insulina y ejerce efectos antiinflamato-

rios y anti apoptóticos en distintos tipos celulares (Turer AT y Scherer PE, 2012). Los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos en individuos obesos (Ye R y Scherer PE, 2013) y son inversamente proporcionales a la cantidad de tejido adiposo visceral (Fuster JJ *et al.*, 2016).

- **Resistina:** es una proteína que puede ser secretada por adipocitos maduros de roedores e inicialmente se sugirió que era el mayor nexo entre obesidad y resistencia a la insulina. Los niveles circulantes de resistina están aumentados en ratones obesos y en ratones diabéticos. Esta proteína ejerce efectos pleiotrópicos en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, en humanos, la principal fuente de esta proteína son los monocitos y los macrófagos. En ratones, la resistina puede promover la aterosclerosis por un mecanismo alternativo mediado por una resistencia a la leptina central y una reducida actividad del tejido adiposo marrón que van a permitir una hipertrigliceridemia (Fuster JJ *et al.*, 2016).

- **La hipótesis del estado inflamatorio del tejido adiposo:** la obesidad está relacionada con la inflamación en el tejido adiposo, debido un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos de tipo M1. Las citoquinas proinflamatorias pueden directamente afectar la sensibilidad a la insulina, principalmente a través de las vías de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y el factor nuclear kappa B (NFκB). Existen evidencias que demuestran que las citoquinas producidas por el tejido adiposo pueden afectar a la sensibilidad a la insulina, por ejemplo, la administración de anticuerpos neutralizantes frente al TNF-α en modelos de ratones obesos disminuye la resistencia a la insulina. (Hotamisligil GS *et al.*, 1993). Como se comentó anteriormente, los ácidos grasos saturados liberados por los adipocitos hipertróficos van a ser capaces de unirse a re-

ceptores que participan en el reconocimiento de patógenos en la inmunidad innata, los TLR 2 y 4 presentes en los adipocitos y en los macrófagos residentes en el tejido. Esto conlleva a la inducción de JNK que fosforila al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) en el aminoácido serina (en lugar de la tirosina que es fosforilada en condiciones fisiológicas), disminuyendo así la señalización de la insulina. (Lopes HF *et al.*, 2016). Niveles elevados de IL-6 y TNF-α están relacionados con la resistencia a la insulina y con la obesidad (Braun S *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha encontrado que en individuos obesos con un IMC >30 Kg/m² existen unos niveles elevados de proteína C reactiva (proteína secretada por el hígado marcador de inflamación, infecciones y daño tisular cuya función es activar el sistema del complemento) (Visser M *et al.*, 1999).

Además de la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2, la obesidad puede causar otro gran número de complicaciones entre las que cabe destacar: dislipidemia, cáncer, hígado graso no alcohólico, complicaciones cardiovasculares y complicaciones respiratorias.

1.1.4.2 Dislipidemia.

Las características principales de la dislipidemia son: elevados niveles de TG en plasma, bajos niveles de colesterol HDL y un aumento de partículas LDL pequeñas y densas. La resistencia a la insulina va a promover la lipólisis en los adipocitos dando lugar a un aumento de los niveles de ácidos grasos libres. En el hígado, estos ácidos grasos van a ser sustrato para la síntesis de TG y van a estabilizar la producción de la apolipoproteína B (ApoB) que conllevará a un aumento de la producción de partículas VLDL (Low Wang CC *et al.*, 2016).

Así, la hipertrigliceridemia, es el resultado

de un aumento de la producción de partículas VLDL, así como de una disminución de su aclaramiento. Las VLDL van a ser metabolizadas dando lugar a otras lipoproteínas y a LDL pequeñas y densas, que son las responsables de la formación de la placa de aterosclerosis. Por otra parte, los TG de las VLDL son transferidos a las HDL por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). Estas HDL enriquecidas en TG son un buen sustrato para la lipasa hepática, de manera que, van a ser eliminadas rápidamente de la circulación impidiendo así el transporte reverso del colesterol desde el sistema vascular (Huang PL, 2009).

1.1.4.3 Hígado graso no alcohólico.

El hígado graso no alcohólico es una de las principales complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. En esta patología se engloban desde los casos de esteatosis hepática (debido a la acumulación de TG en el hígado) hasta los casos de esteatosis hepática combinados con inflamación o esteatohepatitis. Durante la obesidad, la gran liberación de ácidos grasos libres, así como de adipocinas proinflamatorias y que promueven la resistencia a la insulina (elevados niveles de TNF- α e IL-6 y bajos niveles de adiponectina) son los principales responsables de los daños ocasionados en las células hepáticas. (Lopategi A *et al.*, 2016).

1.1.4.4 Complicaciones cardiovasculares.

El IMC está significativamente asociado con la hipertensión y con un mayor riesgo de sufrir apoplejías. Además, índices cintura-cadera y perímetros de cintura elevados están asociados con un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, independientemente del IMC (Hruby A *et al.*, 2016). Debido a la resistencia a la insulina, la inhibición de la vía fosfatidilinositol 3 quinasa-proteína

kinasa B (PI3K-Akt) conlleva una reducción en la producción de óxido nítrico (NO) que dará como resultado a una disfunción del endotelio. Por otra parte, la vía de las MAP quinasas no resulta afectada durante la resistencia a la insulina, de tal forma que, esta vía continuará promoviendo la formación de endotelina 1 (ET-1), la expresión de moléculas de adhesión de células vasculares (VCAM-1) (King GL *et al.*, 2016) así como factores mitogénicos que van a afectar a las células del músculo liso vascular (Figura 1.5). Todas estas alteraciones debidas a la resistencia a la insulina van a promover una mayor predisposición a sufrir aterosclerosis (Huang PL, 2009).

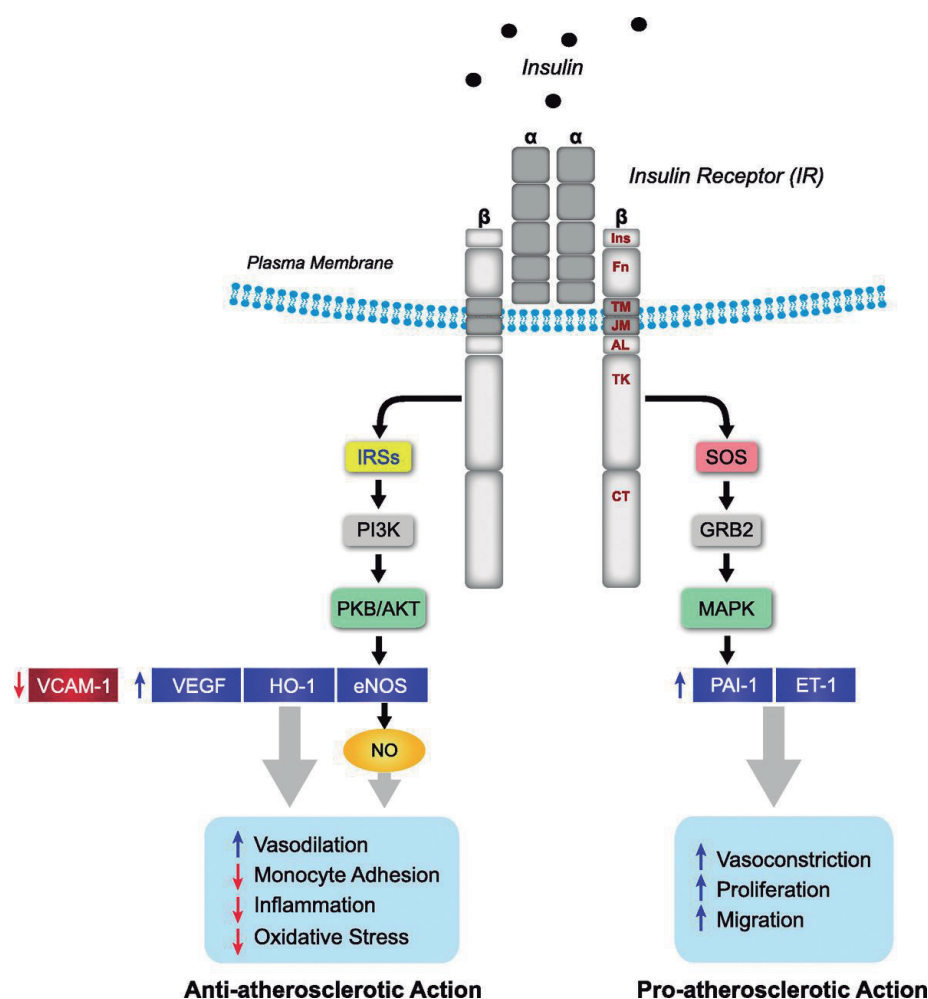


Figura 1.5. Efectos de la resistencia a la insulina en el proceso aterosclerótico. Adaptación de King GL *et al.*, 2016.

1.1.4.5 Cáncer.

En relación al cáncer, la resistencia a la insulina presente en los individuos obesos va a tratar de ser compensada por parte de la célula β dando lugar a una hiperinsulinemia. Los niveles aumentados de insulina van a aumentar la síntesis hepática del factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) que junto con la insulina al unirse a sus receptores van a ser capaces de inducir procesos de proliferación, así como ocasionar una inhibición de la apoptosis que van a contribuir en gran medida al proceso tumorigénico (Forte *et al.*, 2012). Además, el TNF- α y la IL-6 promueven la angiogénesis (Braun S *et al.*, 2011). Se ha demostrado que existe un au-

mento en la expresión del receptor de la insulina en cáncer de mama, colorectal, hígado y próstata, así como del receptor de IGF1 en cáncer de mama, colorectal, hígado, próstata, pulmón, ovarios y de tiroides. (Gallagher EJ y LeRoith D, 2015).

1.1.4.6 Complicaciones pulmonares.

La obesidad puede afectar al sistema respiratorio a través de varios mecanismos, entre los que se incluyen los cambios mecánicos debidos al aumento del depósito de grasa, así como la inflamación sistémica presente en estos individuos. Entre las principales complicaciones cabe destacar una reducción en:

la distensión de los pulmones, el volumen pulmonar y la fuerza de los músculos respiratorios, así como un aumento de la resistencia en las vías respiratorias y la difusión pulmonar. Además de todas estas alteraciones, una de las complicaciones pulmonares más frecuentes en sujetos obesos es la apnea obstructiva del sueño. Esta patología es más prevalente en hombres que en mujeres, con un ratio de incidencia 2:1 y está fuertemente asociada con la obesidad y el síndrome metabólico (Mafort TT *et al.*, 2016).

1.2 EL ÓRGANO ADIPOSO.

En los mamíferos, los tejidos adiposos están incluidos dentro de un órgano con múltiples localizaciones: el órgano adiposo (Cinti S, 2005). Dentro del órgano adiposo podemos encontrar al tejido adiposo blanco, al tejido adiposo marrón y el tejido adiposo *beige*.

1.2.1 Tejido adiposo blanco.

Todos los organismos eucariotas, desde las levaduras hasta los seres humanos son capaces de almacenar calorías en forma de gotas lipídicas, pero solo los vertebrados tienen células especializadas llamadas adipocitos (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014).

1.2.1.1 Estructura y localización.

Este tejido está formado mayoritariamente por adipocitos blancos. Los adipocitos blancos son uniloculares ya tienen una única vacuola lipídica en posición central, presentan un núcleo en posición periférica (Figura 1.6 A) y un bajo número de mitocondrias pequeñas, elongadas y con una disposición de las crestas aleatoria (Frontini A y Cinti S, 2010). Además de las proteínas de la matriz extracelular, los adipocitos están rodeados por una gran variedad de células: células endo-

teliales, células inmunes, fibroblastos, preadipocitos y células madre. Así, los adipocitos maduros solo suponen entre un 20-40% del contenido celular de un depósito graso (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014).

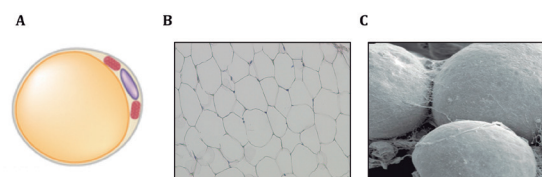


Figura 1.6. Estructura de un adipocito blanco. **A.** Dibujo esquemático de un adipocito blanco donde podemos observar el núcleo en posición periférica (morado), la gran vacuola lipídica en posición central (amarillo) y el escaso número de mitocondrias (rosa). **B.** Tinción de hematoxilina y eosina de un corte de tejido adiposo blanco, aumento 20X. **C.** Microscopía electrónica de barrido de un conjunto de adipocitos blancos, adaptado de Frontini A y Cinti S, 2010.

Dentro del tejido adiposo blanco (White adipose tissue o WAT) podemos encontrar distintas localizaciones. Generalmente, los distintos depósitos de grasa se subdividen en subcutáneos o viscerales en función de su localización.

En ratón, existen dos compartimentos subcutáneos: anterior (compuesto por la localización dorsal e interescapular), y posterior (formado por la localización inguinal, dorso-lumbar y gluteal). En relación al compartimento visceral (Figura 1.10) este se subdivide en: retroperitoneal (rodea a los riñones) mesentérico (incluido entre el intestino), perigonadal (rodea el epidídimo en los machos y en las hembras rodea los ovarios y el útero) (Cinti S, 2005). También se pueden localizar pequeñas cantidades de adipocitos blancos en órganos como: médula ósea, piel, glándulas parótidas y paratiroides, timo, nódulos linfáticos y páncreas (Frontini A y Cinti S, 2010).

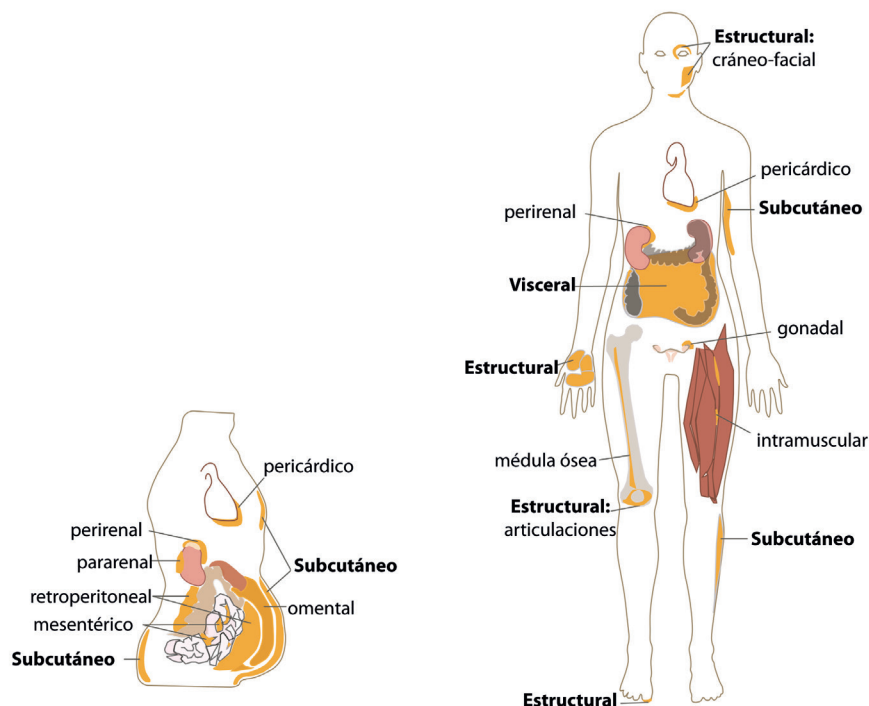


Figura 1.7. Distribución del tejido adiposo blanco en humanos. Las principales localizaciones del WAT son visceral (rodea a los órganos) y subcutáneo (localizado bajo la piel). Adaptado de Cook A y Cowan C, 2009.

En humanos, el compartimento subcutáneo no está confinado a determinadas regiones, sino que forma una capa ininterrumpida a lo largo del cuerpo con la excepción de las manos y los pies. Por otra parte, la distribución de los compartimentos viscerales (Figura 1.7) es muy similar a la de los ratones, a excepción del depósito omental que está muy desarrollado en humanos (Giordano A *et al.*, 2014).

1.2.1.2 Diferenciación y desarrollo.

El desarrollo del WAT varía entre especies, así en roedores, el tejido adiposo blanco se desarrolla principalmente después del nacimiento. En humanos, se observa desarrollo de tejido adiposo blanco desde la semana 14 de gestación. La proliferación tiende a disminuir en las últimas etapas de la gestación y la adiposidad va en aumento debido al llenado de los adipocitos hasta los 10 años de edad, etapa tras la cual tiene lugar un aumento de la celularidad hasta la adolescencia. Este pe-

riodo va a fijar el número total de adipocitos que el individuo tendrá de adulto a pesar de que se van a generar y destruir células a lo largo de la vida. En humanos, alrededor del 8% de los adipocitos son regenerados cada año mientras que en ratón el 0.6% de los adipocitos serán renovados cada día. (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014).

Tanto el tejido adiposo como el músculo, el hueso y el cartílago poseen un origen mesodérmico. Las células madre mesenquimales en un estadio inicial de la diferenciación pueden diferenciarse según la expresión de un factor miogénico denominado Myf5. Así los adipocitos blancos y los adipocitos *beige* se van a desarrollar a partir de las células Myf5- mientras que los adipocitos marrones y los miocitos se desarrollarán a partir de las células Myf5+ (Figura 1.8). El compromiso de las células madres mesenquimales por un determinado linaje celular viene controlado por distintos grupos de proteínas como la familia de los factores morfogenéticos óseos

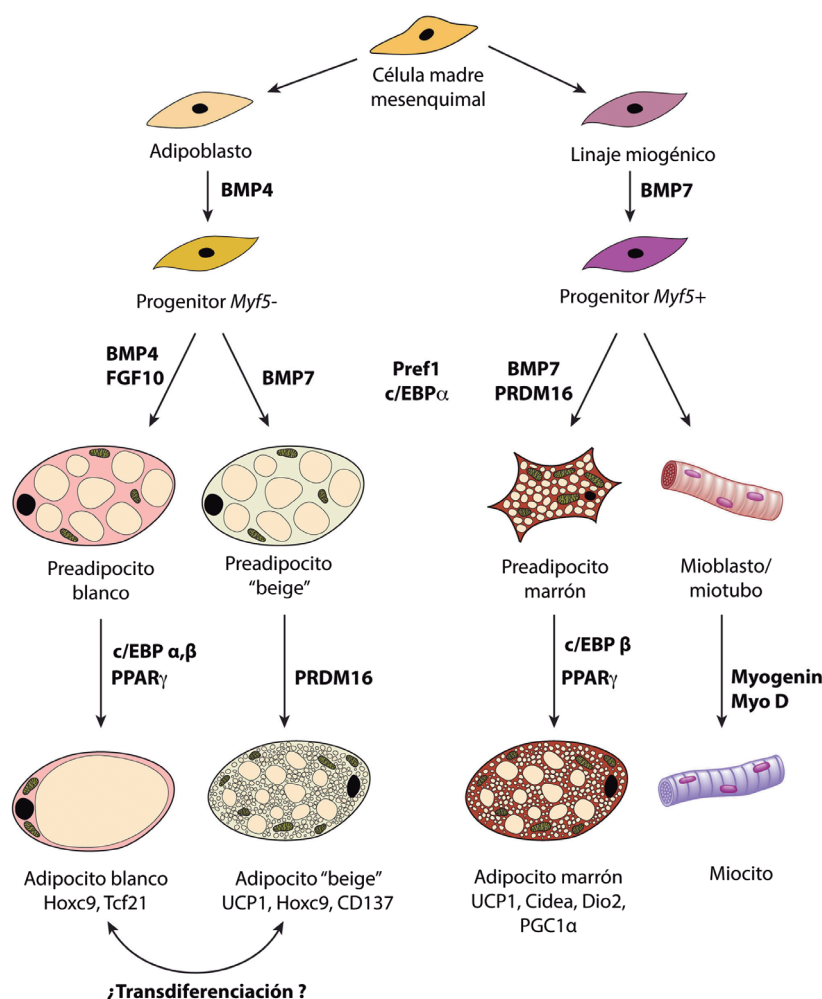


Figura 1.8. Diferenciación de células madre mesenquimales (MSC) a adipocitos blancos, marrones y beige. Adaptación de Obregón MJ, 2014.

(BMPs), la familia de proteínas erizo (hedgehog), la superfamilia de hormonas nucleares, etc.

Las células madre mesenquimales (MSC), procedentes del mesodermo, se localizan en las áreas próximas a los capilares sanguíneos (Algire C *et al.*, 2013). Las MSC, pueden dar lugar a un precursor temprano tanto de adipocitos marrones como blancos denominado adipoblasto. Posteriormente la transición de preadipocito a adipocito maduro tiene lugar en cuatro etapas: parada del crecimiento, expansión clonal, diferenciación temprana y tardía. Los factores de transcripción proteína

α de unión al potenciador CCAAT (C/EBP α) y el activador de la proliferación de peroxisomas γ (PPAR γ) transactivan determinados genes que son los responsables de la parada del crecimiento de los preadipocitos, etapa imprescindible para el inicio del proceso de diferenciación. Tras la parada del crecimiento cuando las células alcanzan la confluencia, tiene lugar al menos una ronda de división celular la cual es denominada expansión clonal mitótica (Tang QQ y Lane MD, 2012). Algunos estudios sugieren que este paso no sería necesario para la diferenciación de los preadipocitos humanos. Las alteraciones en el patrón de expresión génica ocurren du-

rante las etapas de parada de crecimiento y expansión clonal. Así se dispara la transcripción de enzimas involucradas en el transporte de ácidos grasos y en el metabolismo lipídico, como LPL, ácido graso sintasa (FAS), etc. Otro factor de transcripción que es inducido en las primeras etapas de la diferenciación es la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP-1c) el cual está involucrado en el metabolismo del colesterol y la expresión de genes específicos de adipocitos. La última etapa de la diferenciación viene dada por el aumento de la expresión de proteínas involucradas en la lipogénesis *de novo* y en la adquisición de la sensibilidad a la insulina como las enzimas implicadas en el metabolismo de los TG: glicerol 3 fosfato aciltransferasa o glicerol 3 fosfato deshidrogenasa, así como el transportador de glucosa GLUT4 y el receptor de insulina. Además de estos factores, los adipocitos también sintetizan aP2, perilipina y empiezan a secretar adipoquinas. (Rajan S *et al.*, 2014).

Como mencionamos anteriormente, los BMPs son importantes en el compromiso de las células madre para diferenciarse en un linaje celular u otro. Estos factores pertenecen a la superfamilia de los factores de crecimiento transformantes β (TGF- β) y son fundamentales en el proceso de diferenciación ya que bloquean la cascada de expresión génica inducida por PPAR γ y C/EBP α . Existen 14 miembros en la familia de los BMPs (BMP-2 a BMP-15), dentro de los cuales BMP4 estimula la diferenciación de las MSC hacia el linaje adipocítico blanco. Mientras que BMP7 es esencial en la diferenciación de los adipocitos marrones y *beige*. Además, los BMPs van a promover la formación de preadipocitos a través de la regulación del citoesqueleto y los subsecuentes efectos en la morfología celular. (Algire C *et al.*, 2013).

El “regulador maestro” de la adipogénesis es PPAR γ . Este factor es esencial para el

mantenimiento de los adipocitos maduros y puede hacer que células no adiposas como fibroblastos o mioblastos den lugar a adipocitos. La familia de proteínas de unión a secuencias potenciadoras CCAAT o C/EBPs (α , β y δ) también son importantes inductores de la adipogénesis. En etapas tempranas de la diferenciación, C/EBP β es fosforilado por la proteína quinasa inducida por mitógenos (MAPK) y por la proteína quinasa de la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β). Tras esta fosforilación, la proteína va a sufrir un cambio conformacional que va a dar lugar a la formación de un dímero de C/EBP β , creando un bolsillo de unión a ADN. Una vez que c/EBP β es capaz de unirse al ácido desoxirribonucleico (ADN), esto permite el aumento de los niveles de expresión de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α , los cuales permitirán la transcripción de diversos genes implicados en la diferenciación adipocítica. (Algire C *et al.*, 2013).

1.2.1.3 Funcionalidad.

La función más conocida del WAT es actuar como el principal reservorio de energía del organismo, ya que es capaz de acumular ácidos grasos en condiciones de exceso de nutrientes. Gracias a la acción de enzimas lipogénicas, localizadas en el citoplasma y en el retículo endoplasmático, tiene lugar la síntesis de TG los cuales serán almacenados en la vacuola lipídica. Por el contrario, en condiciones de ayuno se dispara la acción de hormonas lipolíticas como HSL o ATGL, las cuales se translocan a la superficie de la vacuola lipídica donde tendrá lugar la lipólisis de los TG. También unida a la superficie de las gotas lipídicas se encuentra la perilipina la cual facilita este proceso. Así los ácidos grasos liberados de los TG son liberados al torrente sanguíneo para ser utilizados por tejidos como el músculo esquelético, músculo cardíaco e hígado. (Tang QQ and Lane MD, 2012). Además, presenta importantes fun-

ciones mecánicas, ya que actúa como barrera protectora de los órganos internos y posee funciones endocrinas, ya que es capaz de liberar un gran número de adipoquinas que ejercerán sus efectos a nivel sistémico.

El WAT también juega un papel importante en la regulación del metabolismo glucídico. Tanto WAT como BAT son tejidos conocidos por la capacidad de expresar el transportador de glucosa GLUT4, el cual va a transportar la glucosa al interior de los adipocitos para su posterior utilización. La glucosa puede ser utilizada como sustrato para la síntesis *de novo* de ácidos grasos, así como la síntesis del glicerol. Por otra parte, de manera indirecta puede influir en el metabolismo de la glucosa de otros tejidos, ya que como hemos comentado anteriormente este tejido juega un papel esencial en la generación de resistencia a la acción de la insulina en tejidos periféricos como hígado, músculo, corazón, etc. (Kushminski CM *et al.*, 2009).

Como se mencionó en apartados anteriores, dentro de las adipoquinas que pueden ser liberadas por el tejido adiposo blanco, las más importantes son: leptina, adiponectina, resistina, TNF- α e IL-6. A lo largo de los últimos años, se han ido estudiando las funciones de otras adipoquinas, las cuales poco a poco han ido adquiriendo una mayor importancia. Entre ellas podemos destacar: RBP4 (proteína de unión a retinol 4), FGF21 (factor de crecimiento fibroblástico 21), aP2 (proteína de adipocitos 2). RBP4 es la principal proteína transportadora de vitamina A en el suero. Se expresa principalmente en el tejido adiposo visceral y sus niveles séricos están asociados con la resistencia a la insulina en roedores y humanos. FGF21 además de ser liberado por el hígado también puede ser liberado por el tejido adiposo. Posee efectos beneficiosos en la pérdida de peso, así como en la mejora de la homeostasis glucídica y lipídica. También puede inducir de manera directa la producción y liberación de adipo-

nectina por parte del tejido adiposo. (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014). La proteína de unión a ácidos grasos (aP2), está codificada por el gen *Fabp4* (proteína de unión a ácidos grasos 4), el cual es uno de los más expresados en los adipocitos. Recientemente, se ha descubierto que puede ser secretada a través de un mecanismo mediado por exosomas. Los niveles séricos de aP2 se encuentran elevados en la obesidad y además promueve la resistencia a la insulina y la gluconeogénesis hepáticas (Cao H *et al.*, 2013).

1.2.2 Tejido adiposo marrón.

El tejido adiposo marrón (BAT) juega un papel esencial en la termogénesis sin tiriteo que tiene lugar tras un periodo de exposición al frío. Hecho que convierte a este órgano, en uno de los más estudiados en los últimos tiempos debido a su potencial como terapia antiobesidad.

1.2.2.1 Estructura y localización.

El tejido adiposo marrón está formado por adipocitos que presentan múltiples vacuolas lipídicas en su citoplasma, por lo que se dice que presentan una disposición multilocular de las mismas. El núcleo de estas células está en una posición central y presentan un gran número de mitocondrias, las cuales son las responsables del color pardo que da nombre a este tejido (Figura 1.9 A) (Frontini A y Cinti S, 2010).

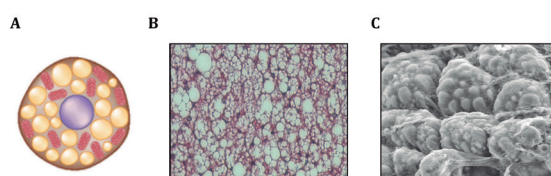


Figura 1.9. Estructura de un adipocito marrón. **A.** Dibujo esquemático de un adipocito marrón donde podemos observar el núcleo en posición central (morado), disposición multilocular de las vacuolas lipídicas (amarillo) y el gran número de mitocondrias (rosa). **B.** Tinción de hematoxilina y eosina de un corte de tejido adiposo marrón, aumento 20X. **C.** Microscopía electrónica de barrido de un conjunto de adipocitos marrones, adaptado de Frontini A y Cinti S, 2010.

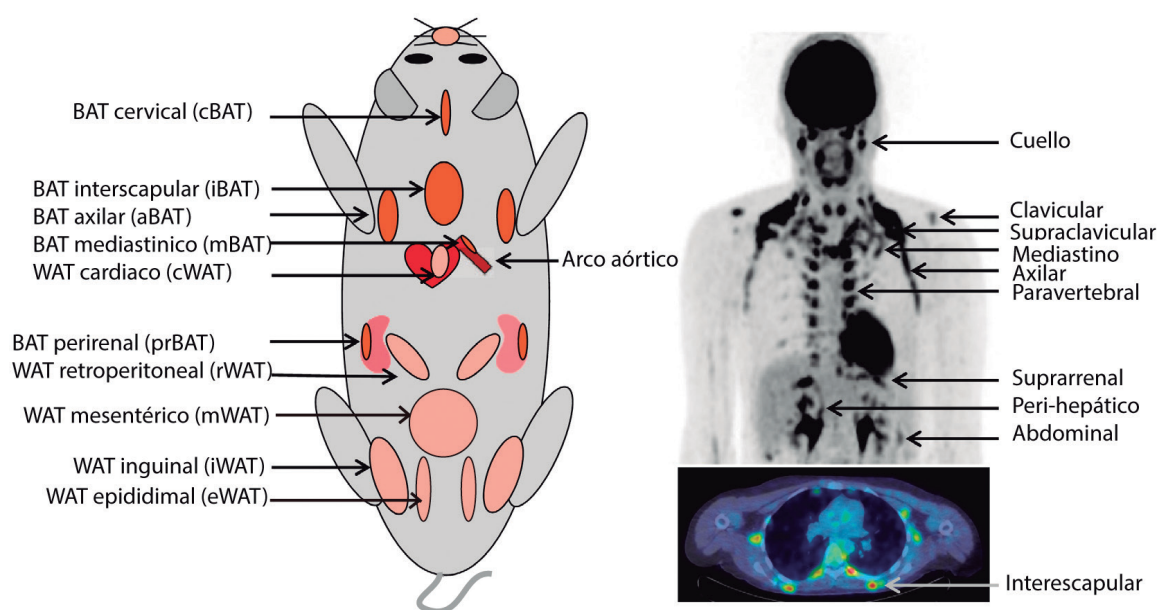


Figura 1.10. Distribución del órgano adiposo. **A.** Distribución del tejido adiposo marrón y compartimentos blancos susceptibles de “beiging” en ratones **B.** En la parte superior de la figura, podemos ver una imagen de una tomografía de emisión de positrones (PET) de un humano delgado donde se demuestra la captación ^{18}F -FDG por parte del tejido adiposo marrón bajo condiciones de exposición al frío. En la parte inferior, se muestra otra imagen de PET donde se muestra un raro ejemplo de BAT interscapular en humanos adultos. Adaptado de [Vosselman MJ et al., 2013](#).

Además, este tejido presenta una alta vascularización (necesaria para promover la oxidación de sustratos y la distribución del calor generado en el tejido), así como una gran inervación simpática ([Kajimura S et al., 2015](#)).

En relación a las distintas localizaciones del tejido adiposo marrón, hay que distinguir que también existen diferencias entre las localizaciones en ratón y en humanos. Así, en ratones, el mayor depósito de BAT se localiza en la región interscapular (iBAT). Esta localización también puede localizarse en humanos sobre todo en neonatos y en niños, siendo rara su existencia en humanos adultos ([Figura 1.10 B](#)) ya que suele ir desapareciendo de manera gradual con el desarrollo. En humanos adultos las principales localizaciones se encuentran en la región del cuello, en el mediastino y en la zona suprarrenal, siendo estas zonas comparables con el cBAT, mBAT y prBAT que podemos encontrar en ratón ([Figura 1.10 A](#)). Además, en humanos también podemos encontrar BAT a lo largo de la mé-

dula espinal, en la región axilar, en la región abdominal y en la zona supraclavicular, zona considerada como la más abundante en humanos adultos ([Vosselman MJ et al., 2013](#)).

1.2.2.2 Diferenciación y desarrollo.

En la evolución, los adipocitos marrones aparecen en los mamíferos euterios (presentan placenta) mientras que el resto de vertebrados, incluidos marsupiales y monotremas (mamíferos que ponen huevos) solo poseen tejido adiposo blanco. En humanos, los recién nacidos presentan una cantidad de tejido adiposo marrón importante. Este, será el encargado de mantener la temperatura corporal ante el nuevo ambiente más frío al que el recién nacido se va a ver expuesto.

El tejido adiposo marrón se desarrolla principalmente durante la etapa fetal, teniendo así todas las características de un tejido maduro en el momento del nacimiento ([Rajan S et al., 2014](#)).

Las células madre mesenquimales en un estadio inicial de la diferenciación pueden diferenciarse según la expresión de un factor miogénico denominado Myf5. Así las células musculares y los adipocitos marrones e van a desarrollar a partir de las células Myf5+. A partir de este punto, además de los factores mencionados con anterioridad, BMP7 va a ser imprescindible durante el proceso de diferenciación de los adipocitos marrones y *beige*. (Rajan S *et al.*, 2014). Junto con BMP7, el cofactor transcripcional PRDM16 es uno de los principales reguladores de la diferenciación de los adipocitos marrones (Figura 1.8). Así la pérdida de PRDM16 en adipocitos marrones en cultivo, promueve la diferenciación muscular, mientras que la expresión de PRDM16 en mioblastos induce su diferenciación a adipocitos marrones (Seale P *et al.*, 2008). PRDM16 estimula la adipogénesis marrón activando PGC1- α (Coactivador 1 alfa del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas), UCP1 (proteína desacoplante 1), DIO2 (desyodasa tipo 2) y otros genes mitocondriales al mismo tiempo que reprime la expresión de genes específicos de adipocitos blancos y de miocitos. Así, durante la diferenciación de los adipocitos marrones, van a aumentar los niveles de PGC1- α . Siendo este factor, el principal regulador de la biogénesis mitocondrial, el metabolismo oxidativo y la termogénesis del tejido adiposo marrón (Puigserver P and Spiegelman BM, 2003).

1.2.2.3 Funcionalidad del tejido adiposo marrón.

El tejido adiposo marrón es el principal responsable de la termogénesis sin tiriteo. Una de las principales características de este tejido, es la presencia de UCP1 en la membrana mitocondrial interna tanto de adipocitos marrones como *beige*.

El tejido adiposo marrón presenta una alta innervación simpática (Spiegelman BM y

Lowell BB, 2000). Durante la exposición al frío (Figura 1.11) tanto los macrófagos M2 como los nervios simpáticos van a producir noradrenalina (NA). La NA va a unirse a los receptores β_3 adrenérgicos (presentes la superficie de los adipocitos marrones), estos receptores están acoplados a la adenilil ciclasa la cual convierte el adenosin trifosfato (ATP) en adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Este AMPc, por una parte, activa a DIO2 de tal forma que se promueve la formación de triiodotironina (T3) en los adipocitos marrones. Por otra parte, el AMPc es capaz de fosforilar a la proteína quinasa A (PKA) la cual va a fosforilar tanto a la Perilipina 1 (situada en la superficie de las gotas lipídicas) así como a la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Rajan S *et al.*, 2014). Por una parte, la perilipina fosforilada se va a liberar de la gota lipídica permitiendo así, que la proteína HSL fosforilada pueda unirse a las vacuolas lipídicas donde tendrá lugar la lipólisis de los TG a ácidos grasos libres y glicerol.

Los ácidos grasos libres transformados a acetil-Coenzima A (acetil-CoA) debido a la acción de la acetil-CoA sintetasa van a ser transformados a acetil-carnitina para poder ser transportados a través de la isoforma M de la carnitil palmitoil transferasa 1 (CPTI-M). Este transportador está localizado en la membrana externa de las mitocondrias presentes tanto en BAT como en WAT. Este paso es el limitante de la β oxidación, ya que la acción de este transportador puede ser inhibida por el malonil-CoA (sustrato intermediario en la lipogénesis *de novo*), de tal forma que se impide la oxidación de los ácidos grasos cuando la célula está en un estado lipogénico. (Rutkowski JM *et al.*, 2015). A continuación, la acetil-carnitina será transportada mediante la carnitil palmitoil transferasa 2 (CPTII) situada en la membrana mitocondrial interna permitiendo la liberación del acetil CoA de la carnitina. La consiguiente β oxidación de los ácidos grasos (Acetil-CoA),

así como la actividad del ciclo del Krebs van a permitir la formación de intermediarios reducidos como el flavín adenín dinucleótido (FADH) y el nicotín adenín dinucleótido (NADH) los cuáles serán oxidados y cederán sus electrones a la cadena de transporte de electrones. Esto va a resultar, en la formación de la fuerza protón-motriz, que conducirá a los protones de vuelta al interior de la matriz mitocondrial a través de la proteína UCP1, transformando esta energía en calor (Cannon B y Nedergaard J, 2004).

La NA permite la fosforilación y activación de p38 MAPK que a su vez fosforila al factor activador de la transcripción 2 (*Atf-2*), el cual se translocará al núcleo donde promoverá la transcripción de *Pgc1- α* . A su vez, *Pgc1- α* será fosforilado y activado para aumentar la transcripción de genes termogénicos, como *Ucp1* en el adipocito marrón (Villaroya F *et al.*, 2017). Por otra parte, la exposición al frío durante horas o días va a dar lugar a un aumento de los niveles proteicos de UCP1, un aumento de la biogénesis mitocondrial, así como una hiperplasia e hipertrofia del BAT (Vosselman MJ *et al.*, 2013).

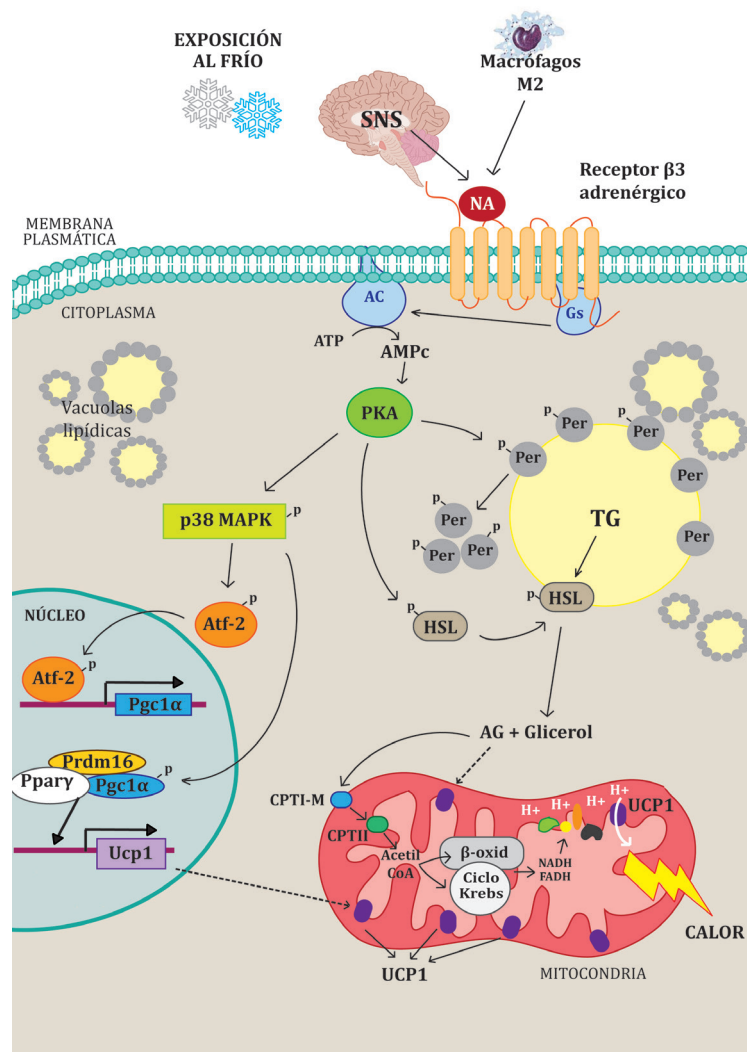


Figura 1.11. Termogénesis sin tiriteo inducida por exposición al frío en adipocitos marrones.

Adicionalmente a su función termogénica, la activación del BAT, también es capaz de mejorar la homeostasis glucídica ya que es uno de los tejidos que presenta un mayor consumo de glucosa. Esta captación de glucosa, puede tener lugar durante la termogénesis (estimulada por la NA) o durante procesos anabólicos (estimulada por la acción de la insulina) (Cannon B y Nedergaard J, 2004). Para comprobar esta hipótesis, el grupo de Goodyear, realizaron experimentos en ratones en los cuales se trasplantó BAT a la cavidad visceral. Tras 8-12 semanas se demostró que los ratones que recibieron el trasplante mejoraron su tolerancia a la glucosa, presentaron un menor peso y una menor masa grasa, así como una reversión de la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas (Stanford KI *et al.*, 2013).

Es importante no olvidar el papel del BAT como órgano secretor. Además de los numerosos activadores descritos en apartados posteriores, el BAT no solo presenta receptores para muchas de estas moléculas, sino que además es capaz de secretarlas. En concreto, el BAT es capaz de secretar BMP7 BMP8b, FGF21, VEGFA (importante en la formación de nueva vasculatura durante la activación del tejido), NO (sus niveles aumentan durante la exposición al frío para garantizar un mayor flujo sanguíneo), endocannabinoides (participan en un *feedback* negativo que regula la activación del BAT por los receptores β_3 y el *beiging* del WAT), IGF1 (su liberación en los trasplantes de BAT sería el responsable de los efectos antidiabéticos observados), neuregulina 4 (disminuye la señalización lipogénica en el hígado) (Wang GX *et al.*, 2014), RBP4 (se libera tras la activación noradrenérgica y favorece el transporte de retinoides liberados durante la lipólisis), betatrofina (inducida en respuesta al frío y sus funciones son inhibir la lipoproteína lipasa e inducir la replicación en la célula β pancreá-

tica), TNF α e IL-1 (son liberados por el BAT en situaciones de obesidad) (Villaroya F *et al.*, 2017).

1.2.2.4 El tejido adiposo marrón en humanos.

Sin embargo, en los adultos, hasta hace aproximadamente una década, se pensaba que el tejido adiposo marrón solo estaba activo en los recién nacidos o bien podía activarse únicamente por periodos de exposición al frío crónicos (como el caso de los trabajadores Escandinavos que desempeñan sus funciones en el exterior) o en condiciones de exceso de catecolaminas como ocurre en el feocromocitoma (tumor en las glándulas suprarrenales) (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014). Gracias al uso de la tomografía de emisión de positrones, donde se observa la captación de glucosa radioactiva ([18F]-2-fluor-D-2-deoxy-D-glucosa) para el diagnóstico del cáncer, se observó la presencia de tejido adiposo marrón metabólicamente activo (Figura 1.12) durante la exposición al frío, en la región supraclavicular y espinal de individuos adultos sanos mientras que no se observó actividad alguna en sujetos obesos (van Marken Lichtenbelt WD *et al.*, 2009).

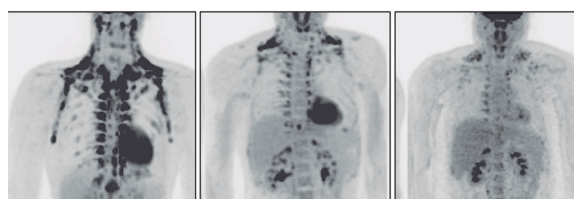


Figura 1.12. Imágenes de PET donde se muestra la captación de glucosa del tejido adiposo marrón en un humano sano con alta actividad (izquierda), un humano sano con una actividad intermedia (centro) y un humano obeso (derecha) (van Marken Lichtenbelt WD *et al.*, 2009).

Otros estudios, mostraron que dentro de la población el 3,1% (hombres) y el 7,1% (mujeres) presentaron un BAT metabólicamente activo, observándose una correlación nega-

tiva entre la actividad del BAT y la edad, la temperatura, los fármacos beta bloqueantes, el IMC (Cypess AM *et al.*, 2009). Biopsias tomadas de sujetos que presentaron un BAT metabólicamente activo, mostraron unos niveles elevados de *Ucp1*, *Dio2*, *Pgc1 α* , *Prdm16* y *Adrb3* (receptor β_3 adrenérgico) en el BAT en comparación con muestras de WAT (Virtanen KA *et al.*, 2009).

Además, estudios en los que se utilizó un trazador radioactivo para observar la captación de ácidos grasos no esterificados (NEFA) también demostró la capacidad oxidativa del BAT en humanos en condiciones de exposición al frío (Ouellet V *et al.*, 2012).

Biopsias de tejido adiposo humano (WAT y BAT) procedente de la zona supraclavicular, han permitido conocer que el BAT de la zona supraclavicular de los humanos posee características de tejido *beige* ya que se ha comprobado que en esta región se expresan genes propios de adipocitos *beige* como: Cd137, proteína transmembrana 26 (Tmem26) o el factor de transcripción “caja T” (Tbx1) (Wu J *et al.*, 2012).

Todos estos estudios nos demuestran el gran potencial del BAT como una posible terapia antiobesidad. De esta manera, a día de hoy, sigue siendo imprescindible la continuación de los estudios en humanos para poder definir posibles activadores del BAT y del “*beiging*” así como el desarrollo de nuevas técnicas que permitan complementar los resultados observados mediante PET.

1.2.2.5 Papel del tejido adiposo marrón como terapia antiobesidad.

En los últimos años, son cada vez más numerosos los estudios donde se considera que la estimulación de la producción de calor por parte del BAT puede llegar a ser una terapia antiobesidad eficaz. Se ha observado que la

actividad del BAT está inversamente relacionada con el IMC y la edad, siendo esta menor en sujetos obesos y en personas de edad avanzada. Además, el aumento de la captación de glucosa por el BAT en sujetos obesos tras una prolongada exposición al frío podría afectar a la homeostasis glucídica y prevenir la resistencia a la insulina. (Trayhurn P, 2016).

Los primeros fármacos que se utilizaron para activar al BAT fueron los **agonistas de los receptores adrenérgicos**. El principal inconveniente de estos fármacos es que pueden ocasionar efectos adversos a nivel cardiovascular (Yen M y Ewald MB, 2012). Estudios llevados a cabo por el grupo de Cypess, han demostrado que la administración oral de un agonista selectivo de los receptores β_3 (Mirabegron) estimulaba la captación de glucosa en los depósitos de BAT y elevaba la tasa metabólica basal cuando se administraba a humanos adultos sanos (Cypess AM *et al.*, 2015). Sin embargo, en sujetos obesos, se ha observado que estos tipos de agonistas poseen una mínima eficacia debido a un defecto en la señalización de estos receptores y/o al desarrollo de resistencia a estos agonistas en el tejido adiposo.

A raíz de estos primeros estudios, en los últimos años se han incrementado de manera exponencial el número de estudios donde se utilizan: compuestos de origen vegetal, suplementos alimenticios, variaciones en las dietas y en la microbiota, los trasplantes de BAT, así como el uso de hormonas o adipocinas circulantes con el fin de activar al BAT y/o promover el *beiging* del WAT.

En relación a los compuestos de origen vegetal, uno de los primeros en ser estudiados fue la **capsaicina** (compuesto que se encuentra en la cayena) donde se demuestra que existe un aumento de la termogénesis inducida por la exposición al frío, en individuos en los

cuales previamente no se había detectado BAT activo antes del tratamiento. (Yoneshiro *et al.*, 2013). Además, otros estudios han demostrado que el uso de análogos de la capsaicina mejora los niveles de glucosa en ayunas, disminuye los TG plasmáticos y hepáticos, disminuye los niveles de leptina, TNF- α , IL-6 y aumenta los niveles de adiponectina y de su receptor en tejido adiposo (Basith S *et al.*, 2016). La capsaicina es capaz de estimular la expresión de *Ucp1*, *Bmp8b* y *Pgc1 α* en WAT y es capaz de inducir el *beiging* mediante el aumento de la expresión de la sirtuina 1 que promueve la deacetilación de PPAR γ y *Prdm16*, facilitando su interacción, para que el proceso de *beiging* tenga lugar (Wankhade UD *et al.*, 2016).

Existen estudios donde se demuestra que la administración de **jalea real** a ratones que fueron alimentados con una dieta rica en grasa, mejora la sensibilidad a la insulina y la hiperglucemia, así como aumenta los niveles de UCP1 y COX IV (citocromo c oxidasa subunidad IV) en el BAT, aunque no se observó *beiging* en el tejido adiposo blanco (Yoneshiro T *et al.*, 2017). Otros grupos, han observado que la suplementación a ratones de extracto de **Rosa Mosqueta** provocó una disminución en los niveles de glucosa, insulina y colesterol plasmáticos; así como un aumento del gasto energético debido a una mayor activación del BAT (Cavalera M *et al.*, 2016).

La **restricción de aminoácidos en la dieta** como la metionina o la leucina ha sido asociada con un aumento de la expresión de *Ucp1* y de sus niveles proteicos en BAT, iWAT, eWAT y rWAT en ratones, debido a un aumento de la activación del SNS (Merlin J *et al.*, 2016). Los efectos debidos a la restricción de metionina (aumento gasto energético y aumento de la sensibilidad a la insulina) recientemente han sido adjudicados al aumento de la producción hepática de FGF21 (Wanders

D *et al.*, 2017). En este sentido, la subnutrición materna en el periodo perinatal (desde que los embriones tienen 14 días hasta el final de la lactancia) aumenta la aparición de adipocitos *beige* en el eWAT de las ratas recién nacidas, debido posiblemente a efectos indirectos sobre el SNS. Además, estos animales presentaron elevados niveles de NA en plasma y una muy baja cantidad de WAT, lo cual hace que estos animales compensen esta situación aumentando la termogénesis para poder mantener así una correcta temperatura hasta que puedan alcanzar unos niveles adecuados de WAT (Bonet ML *et al.*, 2013; Merlin J *et al.*, 2016).

El **Resveratrol**, es un polifenol que está presente en las uvas y en otras plantas. En 2003, fue identificado como una pequeña molécula capaz de activar a SIRT1. SIRT1 necesita la presencia de nicotín adenín dinucleótido (NAD $^{+}$) para su actividad deacetilasa, ligando así la actividad de SIRT1 con los niveles de energía celulares. SIRT1 es inducido en condiciones de restricción calórica y durante el ejercicio y ejerce un papel importante en la regulación de la homeostasis glucídica y lipídica (de Ligt M *et al.*, 2015). Ratones alimentados con dieta rica en grasas (HFD) a los que se les administró una alta dosis de Resveratrol mostraron un papel protector del mismo frente al desarrollo de obesidad inducida por la dieta, a la resistencia a la insulina y también ocasionó un aumento del gasto energético basal. En dicho estudio, el Resveratrol provocó un aumento del tamaño, del contenido de ADN y de la actividad mitocondrial en el BAT (Lagouge M *et al.*, 2006). En otros estudios, animales tratados con Resveratrol durante dos meses presentaron una menor acumulación de grasa, una disminución de los niveles de colesterol y de glucosa plasmáticos, así como un aumento de la expresión de *Ucp1*, *Sirt1* y *Bmp7* en el BAT (Andrade JM *et al.*, 2014). Otros estudios también han demostrado que el resveratrol

es capaz de inducir el proceso de *beiging* en el iWAT, observándose aumentos de UCP1 y citocromo C a nivel proteico y aumento de la expresión de *Prdm16*, *Cidea*, *Elovl3* y *Pgc1α*, *Cd137*, *Tbx1* y *Tmem26* (Wang S *et al.*, 2015). En humanos, el tratamiento con Resveratrol durante 30 días de sujetos obesos, redujo de manera significativa la tasa metabólica basal, activó la AMPK, incremento los niveles proteicos de SIRT1, PGC1α y la actividad citrato sintasa sin cambios en el contenido mitocondrial en el músculo. También se disminuyeron los lípidos intrahepáticos, así como los niveles de glucosa y TG en plasma, concluyéndose que el Resveratrol actuó como un mimético de los efectos observados durante la restricción calórica (Timmers S *et al.*, 2011).

La **microbiota**, contribuye al metabolismo del hospedador a través de cambios dinámicos en los metabolitos, nutrientes y vitaminas siendo esencial en el mantenimiento de la homeostasis energética. Se ha observado que durante la exposición al frío tiene lugar una remodelación de la microbiota la cual juega un papel importante en el “*beiging*” del tejido adiposo. Para demostrar este hecho, se realizaron experimentos en los cuales se trasplantó la microbiota de animales previamente expuestos al frío a ratones libres de gérmenes, observándose un aumento significativo de la sensibilidad a la insulina y un aumento del *beiging* en respuesta al frío en los ratones receptores (Chevalier C *et al.*, 2015).

Otra de las estrategias para aumentar la actividad del BAT y así luchar contra la obesidad, es el **trasplante de BAT**. Estudios realizados en ratones alimentados con dieta grasa, a los cuales se les realizó un trasplante de BAT bajo la piel de la zona dorsal, mostraron una resistencia a la obesidad inducida por la dieta debido a un aumento en el gasto energético. El principal inconveniente de estos trasplantes es que el tejido esta menos

vascularizado e innervado que el iBAT por lo que existe un alto riesgo de necrosis. Además, en algunos casos pasadas las semanas las células del tejido trasplantado empiezan a adquirir una morfología más similar a los adipocitos blancos (Zhu Z *et al.*, 2014). Existe la posibilidad terapéutica de utilizar células madre multipotentes procedentes del tejido adiposo para ser diferenciadas *in vitro* y posteriormente ser implantadas en el área interescapular, con el fin de restaurar la funcionalidad del BAT en humanos. Es evidente, que este tipo de estrategias pueden tener un amplio potencial como terapias antiobesidad, pero debido a los numerosos inconvenientes que han sido observados es necesario que continúen las investigaciones para que estas terapias puedan ser consideradas en un futuro próximo (Roman S *et al.*, 2015).

Numerosas hormonas circulantes están implicadas en la activación del tejido adiposo marrón (Figura 1.13) además de las catecolaminas como, por ejemplo: la **T3** la cual es generada a partir de la tiroxina presente en el suero gracias a la acción de DIO2 presente en adipocitos marrones y *beige*. El BAT posee un elevado número de receptores de hormonas tiroideas α_1 ($TR\alpha_1$) y β_1 ($TR\beta_1$). Así la isoforma α_1 , es necesaria para el mantenimiento de una correcta respuesta adrenérgica por parte de los adipocitos marrones, mientras que la isoforma β_1 media la inducción de UCP1 (Martínez-Sánchez N *et al.*, 2014). La administración de T3 a nivel central afecta a las células del núcleo ventromedial del hipotálamo, donde tiene lugar una disminución de la activación de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), lo que permite que aumente el tono simpático del BAT (Alvarez-Crespo M *et al.*, 2016) y el aumento de la expresión de PGC1α (debido a la presencia de elementos de respuesta a T3 presentes en el promotor) que conllevará finalmente a un aumento de los niveles de UCP1 (Lidell ME *et al.*, 2014).

La **melatonina**, es una hormona secretada por la glándula pineal, alcanza sus mayores niveles durante la noche y está implicada en el control del balance energético. Así, su administración disminuye el peso corporal en ratones obesos sin alteraciones en la ingesta, tiene efectos antidiabéticos e incrementa el gasto energético mediante la activación del BAT (Roman S *et al.*, 2015). También es capaz de inducir el *beiging* en el iWAT mediante un aumento de la expresión de *Ucp1* y *Pgc1 α* . El mecanismo exacto mediante el cual la melatonina ejerce estos efectos sobre el BAT y el *beiging* no ha sido bien estudiado, aunque se cree que estos efectos pueden deberse a un aumento del tono simpático, a aumentos en *Dio2* o a la inducción de la expresión de Irisina debida al aumento de la actividad locomotora (Jiménez-Aranda A *et al.*, 2013).

La inducción de PGC1- α en el músculo esquelético debida al ejercicio promueve la producción de FNDC5 (proteína 5 con dominios de fibronectina de tipo III). El gen *Fndc5* codifica para una proteína de membrana de tipo I que cuando es procesada proteolíticamente va a dar lugar a una hormona denominada **Irisina** que puede ser secretada al torrente circulatorio. Existen estudios donde se demuestra que la irisina es capaz de inducir cambios en el tejido adiposo inguinal, estimulando el *beiging* y la expresión de *Ucp1*. (Boström P *et al.*, 2012). Además, el grupo de Spielgeman demostró que la irisina puede ser producida tanto en ratones como en humanos y que ambas presentaban un 100% de homología. En los últimos años, ha existido una gran controversia debido a que los resultados obtenidos en humanos han sido muy criticados. En 2015, se demostró que los anticuerpos policlonales utilizados en el ELISA para detectar la irisina humana en plasma no eran específicos y podían estar reaccionando con otras proteínas (Albrecht E *et al.*, 2015). Ante esta controversia finalmente el grupo de Spielgeman realizó los es-

tudios oportunos mediante espectrometría de masas para demostrar fehacientemente que la proteína irisina estaba presente en humanos (Jedrychowski MP *et al.*, 2015). Recientemente, el grupo de Yang ha demostrado los efectos de la irisina en adipocitos humanos, demostrando que el tratamiento con irisina de los adipocitos subcutáneos produce un aumento de la proteína UCP1, un aumento de la respiración mitocondrial y una inhibición de la diferenciación adipogénica (Zhang Y *et al.*, 2016).

FGF21 es secretado principalmente por el hígado donde está implicado en la homeostasis glucídica, en la sensibilidad a la insulina y en la cetogénesis. Sin embargo, tras la activación termogénica el BAT adquiere la capacidad de producir FGF21 a nivel sistémico. Este hecho tiene lugar gracias a que el aumento de AMPc, tras la unión de la NA a los receptores β_3 adrenérgicos, va a promover la transcripción del FGF21 (Hondares E *et al.*, 2011). Ratones carentes de FGF21 mostraron una deficiencia en la cetogénesis y en la gluconeogénesis y desarrollaron una prematura hipoglucemia en respuesta al ayuno. Además, estos animales mostraron una menor captación de glucosa en el BAT en respuesta a la re-alimentación. Tanto en ratones como en humanos obesos, es frecuente observar elevados niveles de FGF21 en suero debido a el desarrollo de un estado de resistencia a este factor. Por otra parte, en los experimentos de exposición al frío, los ratones deficientes de FGF21 presentaron una menor temperatura corporal, así como unos mayores niveles de creatinina quinasa debido a un aumento del tiriteo. Se ha demostrado que el FGF21 puede mejorar diversos parámetros metabólicos como el peso corporal, así como los niveles de insulina y de lípidos en humanos obesos con diabetes de tipo 2. Por otra parte, gracias a su habilidad para reducir los niveles de insulina e IGF1, la administración a largo plazo de este com-

puesto ha demostrado el aumento de la vida media en ratones, siendo la pérdida de hueso el único efecto adverso observado (Owen BM *et al.*, 2015).

Los **ácidos biliares**, a través de su receptor acoplado a proteínas G (TGR5), son capaces de activar a la desyodasa que promueve la formación de T3, promoviendo así un aumento del gasto energético en ratones (Watanabe M *et al.*, 2006). Estudios realizados en 12 mujeres sanas tratadas con ácido quenodesoxicólico (CDCA) resultó en un aumento de la actividad del BAT y el gasto energético. Experimentos *in vitro* con adipocitos marrones primarios humanos, tratados con CDCA o agonistas de TGR5, presentaron un mayor desacoplamiento mitocondrial y expresión de *Dio2*, demostrándose así que los ácidos biliares son también activadores del BAT en humanos (Broeders EP *et al.*, 2015).

Los **BMPs** tienen un papel importante en la diferenciación de los diferentes linajes de adipocitos. Además de estas funciones varios BMPs tienen acciones activadoras del BAT. La expresión de adenoviral de BMP7 en ratones resultó en un aumento de la masa de BAT, pero no de WAT y permitió un aumento del gasto energético y una reducción del peso corporal (Tseng YH *et al.*, 2008). BMP7 también es capaz de aumentar la actividad mitocondrial de adipocitos marrones maduros incrementando la captación y oxidación de ácidos grasos (Townsend KL *et al.*, 2013). Además de sus efectos sobre el gasto energético también se han observado efectos del BMP7 en el control de la ingesta alimentaria. Ratones obesos tratados con BMP7 mostraron un aumento del gasto energético y una disminución de la ingesta, que ocasionó una reducción en el peso corporal y una mejora del síndrome metabólico (Townsend KL *et al.*, 2012). BMP8b se expresa tanto en el BAT maduro como en el sistema nervioso central (SNC) donde tiene como funciones regular la termogénesis y el balance energético. (Whit-

tle AJ *et al.*, 2012). Las hormonas tiroideas y las catecolaminas ambas inducen la formación de BMP8b el cual, por una parte, aumenta la sensibilidad del adipocito marrón a las catecolaminas y, por otra parte, actúa directamente sobre la señalización del sistema nervioso simpático (SNS) sobre el tejido adiposo marrón (Villaroya F y Vidal-Puig A, 2013).

Los **péptidos natriuréticos (NPs)** atrial (ANP) o cerebral (BNP) tienen la capacidad de inducir el *beiging* de los depósitos de WAT. Los niveles de estos péptidos en el plasma aumentan considerablemente en respuesta a la exposición al frío y/o durante el ejercicio (Merlin J *et al.*, 2016). La infusión de NPs, ocasiona un aumento del gasto energético y de la expresión de genes termogénicos en el WAT subcutáneo. Estos péptidos cuando se unen a sus receptores van a provocar un aumento de los niveles de AMPc y una activación de la proteína quinasa G (PKG) la cual ejercerá acciones similares a la PKA. Así se producirá la activación de la HSL para inducir la lipólisis, así como una fosforilación de la p38 MAPK que fosforila a PGC1 α promoviendo así la transcripción de *Ucp1* (Bordicchia M *et al.*, 2012; Lidell ME *et al.*, 2014).

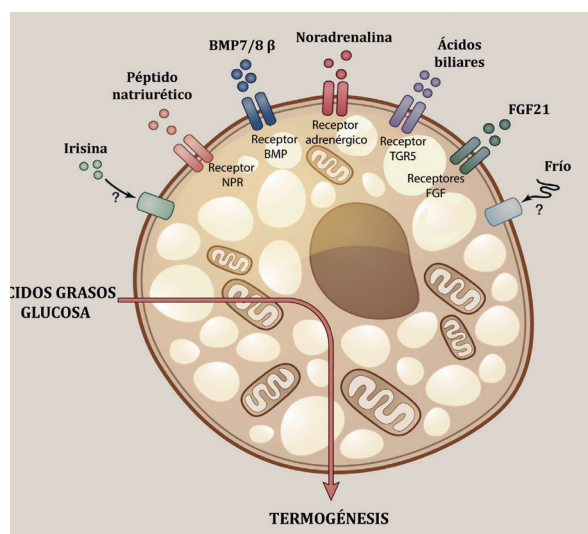


Figura 1.13. Activadores del desarrollo y la funcionalidad de los adipocitos marrones/ *beige*. Adaptado de (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014).

El **sistema endocannabinoide** es ampliamente conocido por su papel en la regulación del apetito y en el control del metabolismo glucídico y lipídico. (Lopategui A *et al.*, 2016). Además de estas funciones ampliamente conocidas, la también se ha relacionado con este sistema la activación del BAT y el *beiging* del WAT mediante la exposición al frío. Antagonistas periféricos del receptor de cannabinoides 1 (CB1) activan la termogénesis adaptativa en el BAT y aumenta los niveles de UCP1, la biogénesis mitocondrial y la tasa de consumo de oxígeno en adipocitos blancos induciendo así el *beiging* (Perwitz N *et al.*, 2010). La estimulación del tono endocannabinoide durante la exposición al frío ha sido propuesta como un mecanismo de *feedback* negativo que controla la activación del BAT a través de los receptores $\beta 3$ y el “*beiging*” del WAT (Richard D, 2015).

1.2.2.6 La mitocondria en el tejido adiposo marrón.

El gran número de mitocondrias presentes en el BAT hacen de este tejido un candidato perfecto para estudiar los procesos de control de calidad mitocondrial.

• DINÁMICA MITOCONDRIAL Y SU PAPEL EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.

Las mitocondrias son orgánulos que presentan una enorme plasticidad a la hora de cambiar su forma. Gracias a los procesos de fusión (unión de mitocondrias) y fisión (escisión de mitocondrias), va a tener lugar una reorganización de los componentes mitocondriales seguido de la eliminación de las mitocondrias dañadas, con el fin de mantener una población de mitocondrias sanas. Además, los procesos de dinámica mitocondrial son importantes para la viabilidad celular, la senescencia, el control de calidad, la señalización celular y permiten que las mito-

condrias puedan adoptar la forma más conveniente según las necesidades energéticas de la célula (Liesa M y Shirihai OS, 2013).

Las células expuestas a un ambiente rico en nutrientes tienden a mantener sus mitocondrias en un estado fragmentado mientras que las células expuestas a privación de nutrientes mantienen sus mitocondrias fusionadas durante más tiempo (Figura 1.16). De esta manera los principales procesos que tienen lugar durante el remodelado mitocondrial son:

- **Fusión mitocondrial:** la fusión mitocondrial es un proceso relacionado con el aumento de la eficiencia bioenergética que conlleva la fusión de dos membranas lipídicas (membrana mitocondrial externa e interna) (Figura 1.16, etapa 1) (Liesa M y Shirihai OS, 2013). Este mecanismo, depende del potencial de la membrana mitocondrial y del GTP (guanín trifosfato) e incluye la participación de diversas proteínas. **OPA-1** (atrofia óptica tipo 1) está localizada en la membrana mitocondrial interna mientras que las **Mitofusinas 1 y 2** están localizadas en la membrana externa (Figura 1.14). OPA1 presenta 8 isoformas alternativas en humanos, las cuales ejercen distintas actividades en la inducción de la fusión y en la morfología de las crestas mitocondriales. Esta proteína presenta dos isoformas generadas por proteólisis, una isoforma pequeña y soluble que carece de dominio transmembrana (S-OPA-1) y una isoforma larga principalmente anclada a la membrana mitocondrial interna (L-OPA-1) (Zorzano A *et al.*, 2009).

El proceso de fusión va a depender de la isoforma L-OPA-1, mientras que S-OPA-1 es asociada con la fisión mitocondrial. El procesamiento de OPA-1 se debe a la acción de dos proteasas que están localizadas en la membrana interna mitocondrial: OMA1 y YME1L1. El procesamiento de OPA-1 mediado por YME1L1 asocia la fusión de la mem-

brana mitocondrial interna a la funcionalidad de la cadena de transporte electrónica. Sin embargo, bajo condiciones de estrés (estrés oxidativo, despolarización mitocondrial, etc.) OMA1 se activa e inhibe el proceso de fusión mediante el procesamiento de la isoforma L-OPA-1 (Quirós PM *et al.*, 2015)

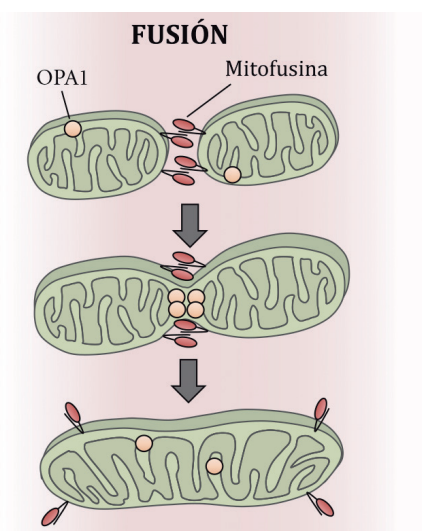


Figura 1.14. Proceso de fusión mitocondrial con las principales proteínas implicadas OPA-1 y Mitofusinas 1 y 2. Adaptado de (Kanamaru Y *et al.*, 2012).

La privación de nutrientes ocasiona una inhibición de la fisión mitocondrial gracias a la inhibición del reclutamiento de Drp1 a la membrana externa, permitiendo así que las mitocondrias permanezcan en un estado elongado. En este estado, las mitocondrias se mantienen protegidas de la autofagia inducida por la privación y aumentan el número de crestas necesario para la dimerización de la ATP sintasa que conducirá a una mayor actividad de la misma. Además de la privación de nutrientes, la activación de la apoptosis (etapas tempranas), el estrés oxidativo (tratamiento con peróxido de hidrógeno), o la senescencia van a inducir la elongación de las mitocondrias. El proceso de senescencia, se caracteriza por una disminución de la capacidad proliferativa, una desregulación homeostática y una disminución en la biogénesis mitocondrial que será compensada

con un aumento en la síntesis de ATP como hemos comentado anteriormente (Liesa M y Shirihai OS, 2013).

- **Fisión mitocondrial:** las principales proteínas involucradas en este proceso son **Drp1** (proteína relacionada con dinamina), **Mff** (factor de fisión mitocondrial) y **Fis1** (proteína homóloga de fisión 1) (Figura 1.15).

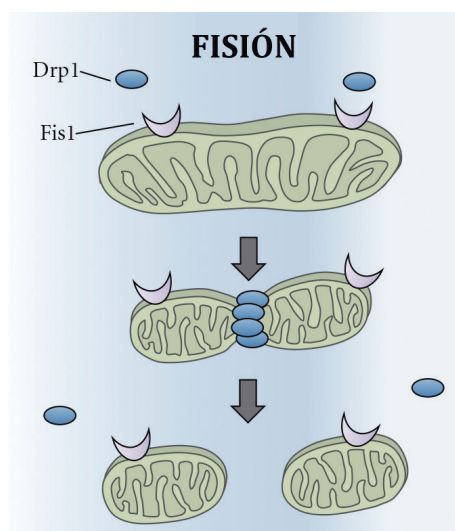


Figura 1.15. Proceso de fisión mitocondrial con las principales proteínas implicadas Drp1 y Fis1. Adaptado de (Kanamaru Y *et al.*, 2012).

Drp1 está localizada en el citosol y no contiene ningún dominio transmembrana, por lo que para mediar la fisión de la membrana mitocondrial externa debe unirse a Fis1 y/o Mff los cuales se encuentran anclados a la membrana externa (Zorzano A *et al.*, 2009). Durante este proceso, se van a generar dos mitocondrias hijas que presentarán diferentes potenciales de membrana. La mitocondria hija con menor potencial de membrana tendrá dos opciones: 1) recuperar su potencial de membrana para así poder volver a entrar en el ciclo fusión-fisión o 2) permanecer despolarizada. Si el potencial de membrana no es restaurado, OPA-1 será degradado y esta mitocondria perderá su capacidad de volver a entrar en el ciclo y será degradada por Mitofagia (Figura 1.16, etapas 2-5). El pro-

ceso de fragmentación ha sido asociado a una mayor susceptibilidad a la apoptosis, ya que este proceso resulta perjudicial para la función respiratoria de las mitocondrias y además se ha visto que Drp1 interacciona con Bclx (proteína similar a Bcl2) facilitando la liberación del citocromo C (Shirihai O *et al.*, 2015).

Células estimuladas con desacopladores de la cadena de transporte electrónico como CCCP (carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona o FCCP (carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona), ocasionan una fragmentación de las mitocondrias, una despolarización masiva de las membranas mitocondriales, el reclutamiento de Drp1 a la membrana externa y la degradación de OPA-1. La despolarización de la membrana resultado de la acción

de estos desacopladores, va a ocasionar la degradación de las proteínas Mfn1 y 2 por la vía del proteasoma, en condiciones donde la ubiquitin ligasa E3 Parkina este sobre-expresada. De esta manera, la fragmentación mitocondrial es un sistema ventajoso para que las mitocondrias alcancen su capacidad respiratoria máxima o para una efectiva despolarización y respiración desacoplada. Así, la remodelación de las crestas mitocondriales que tiene lugar durante el proceso de fisión, va a favorecer la entrada de los nutrientes a las misma y se va a inhibir la dimerización de la ATP sintasa (Liesa M y Shirihai OS, 2013). En este proceso de remodelación va a jugar un papel importante el procesamiento de OPA-1, aumentando de manera considerable los niveles de la isoforma S-OPA-1 (Wikstrom JD *et al.*, 2014).

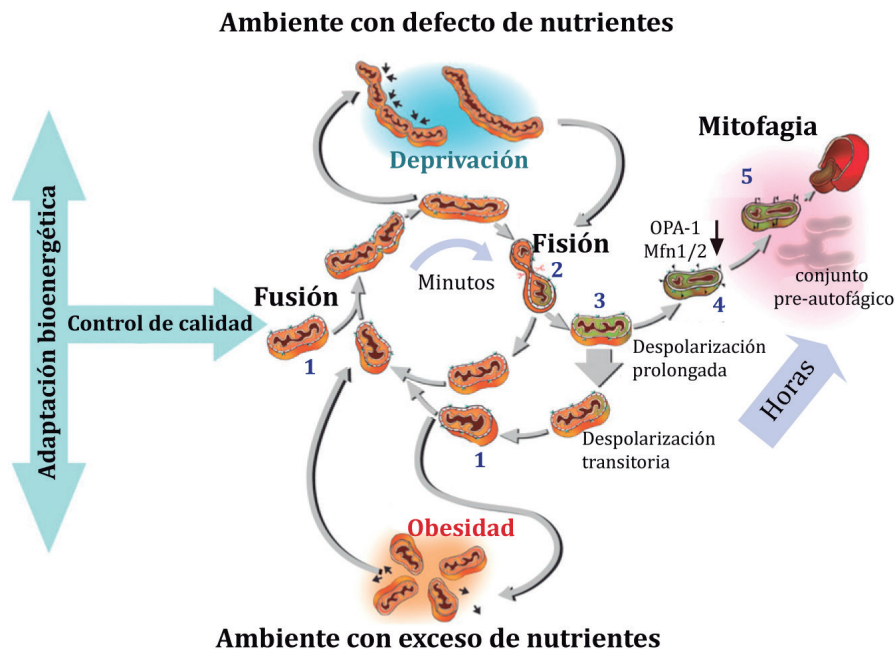


Figura 1.16. El ciclo vital de las mitocondrias y su regulación por la disponibilidad de nutrientes. El ciclo es caracterizado por procesos de fusión y de fisión. La fusión genera una red en la cual componentes de dos mitocondrias son mezclados y reorganizados (1). El proceso de fisión, divide en cuestión de minutos, a las mitocondrias fusionadas en dos mitocondrias hijas con un potencial de membrana disipado (2). La mitocondria hija con el mayor potencial de membrana es la primera en volver al ciclo de fusión-fisión, mientras que la hermana con un potencial de membrana más despolarizado permanece sola hasta que se restaura su potencial de membrana (3). Si el potencial de membrana permanece despolarizado, esta mitocondria pierde su habilidad para fusionarse y pasa a formar parte del conjunto pre-autofágico (4). Entre 1-3 horas después, esta mitocondria será eliminada mediante Mitofagia (5). Adaptado de (Liesa M y Shirihai OS, 2013).

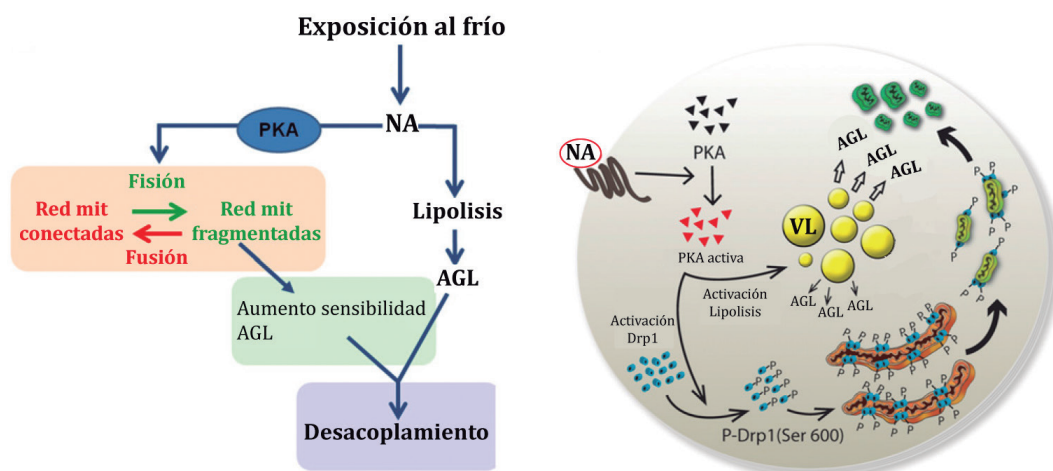


Figura 1.17. Modelo del papel de la dinámica mitocondrial en el tejido adiposo marrón. El desacoplamiento mitocondrial en los adipocitos marrones es el resultado de la acción coordinada dos vías que actúan de manera sinérgica. Por una parte, la noradrenalina (NA) induce la producción de ácidos grasos libres (AGL) mediante la activación de la Lipólisis. Por otra parte, existiría una vía que amplificaría la sensibilidad de la mitocondria a los AGL mediante cambios en su arquitectura (fisión mitocondrial) dependientes de la proteína quinasa A (PKA). La combinación de un estímulo adrenérgico y los AGL activarían ambas vías induciendo un aumento en la Termogénesis/Desacoplamiento. Adaptado de (Wikstrom JD *et al.*, 2014).

El BAT cuando es estimulado tiende a pasar de un estado de alta a un estado de baja eficiencia bioenergética, siendo la energía obtenida de la oxidación de los nutrientes dirigida principalmente a la producción de calor en lugar de a la síntesis de ATP (Liesa M y Shirihai OS, 2013). Se ha descrito que en respuesta a NA, tiene lugar una fragmentación de las mitocondrias como resultado de la fosforilación de Drp1 y del procesamiento de OPA-1 a su forma corta. En este sentido, el grupo de Shirihai, propuso que la fragmentación debida a la fosforilación de Drp1 era mediada por la PKA en respuesta al frío (Figura 1.17). Así la fragmentación de las mitocondrias que tiene lugar tras la estimulación noradrenérgica, sería una vía que actuaría de manera sinérgica con el aumento de la lipólisis para inducir la termogénesis en el tejido adiposo marrón. (Wikstrom JD *et al.*, 2014).

• MECANISMOS DE CALIDAD CITOPASMÁTICA: MITOFAGIA.

La autofagia, es un proceso mediante el cual componentes citoplasmáticos incluidos macromoléculas y orgánulos dañados (mito-

condrias, peroxisomas y retículo endoplasmático) son degradados por los lisosomas. La autofagia es un proceso importante en el control de calidad citoplasmático de las células. Las funciones principales de este mecanismo son: 1) Degradación de componentes para su reciclaje y/u obtención de energía en condiciones de estrés energético 2) Degradación de proteínas mal plegadas o agregadas que pueden ser perjudiciales para la célula, función realizada en conjunto con el proteasoma y el retículo endoplasmático y 3) Degradación de orgánulos dañados o control de su número esencial durante la diferenciación de algunos tipos celulares.

Existen tres tipos diferentes de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia (Figura 1.18). La **macroautofagia** (a la cual nos referiremos como autofagia a partir de ahora) es probablemente la única de las tres vías involucrada en la degradación de orgánulos. Este proceso consiste en el empaquetamiento del material citoplasmático en una estructura formada por una doble membrana denominada auto-

fagosoma. Tras su formación, el autofagosoma se va a fusionar con los lisosomas (formando el autofagolisosoma) para facilitar la degradación de su contenido (Lavallard VJ *et al.*, 2012). La **microautofagia** consiste en la captación directa de componentes citosólicos por parte de lisosomas, mediante una invaginación de la membrana lisosomal. Por último, en la **autofagia mediada por chaperonas**, los polipéptidos y las proteínas solubles se unen a las chaperonas para ser incorporadas directamente a los lisosomas. (Arias E y Cuervo AM, 2011).

La formación del fagóforo y el autofagosoma requiere 18 proteínas Atg (proteínas relacionadas con la autofagia) identificadas inicialmente en levaduras pero que presentan sus homologos en mamíferos. Este proceso requiere tres pasos fundamentales: **iniciación** (controlado por el complejo ULK1 (Quinasa 1 similar a UNC51)-Atg13-FIP200 (Familia de quinasas FAK que interactúan con proteínas de 200 kDa), **nucleación** (requiere la formación del complejo Beclina1-PI3K

de clase III) y **elongación** (involucra la acción de dos complejos: 1) el complejo Atg12-Atg5-Atg16 y 2) escisión de LC3 (cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1 o Atg8) por Atg4 permitiendo que la forma soluble de LC3-I se pueda conjugar con fosfatidiletanolamina (PE) gracias a la acción de Atg 7 y Atg3 (Figura 1.19). Esta conjugación da lugar a la forma LC3-II que se asocia a la doble membrana permitiendo la finalización de la formación de la vacuola autofágica. Tras la formación del autofagosoma, este se va a fusionar con los lisosomas para degradar su contenido (Lavallard VJ *et al.*, 2012).

Dentro de la autofagia, vamos a centrarnos en la Mitofagia, proceso encargado de degradar las mitocondrias dañadas. Durante la privación de nutrientes, las mitocondrias despolarizadas pueden ser secuestradas dentro de autofagosomas para ser degradadas por mitofagia. Dentro de la mitofagia podemos distinguir varios tipos según las proteínas implicadas:

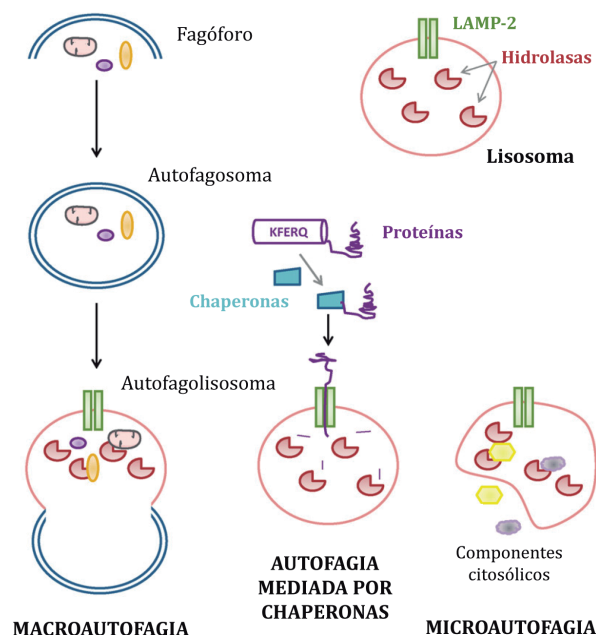


Figura 1.18. Esquema resumen donde se muestran los tres tipos principales de autofagia. Adaptado de (Lavallard VJ *et al.*, 2012).

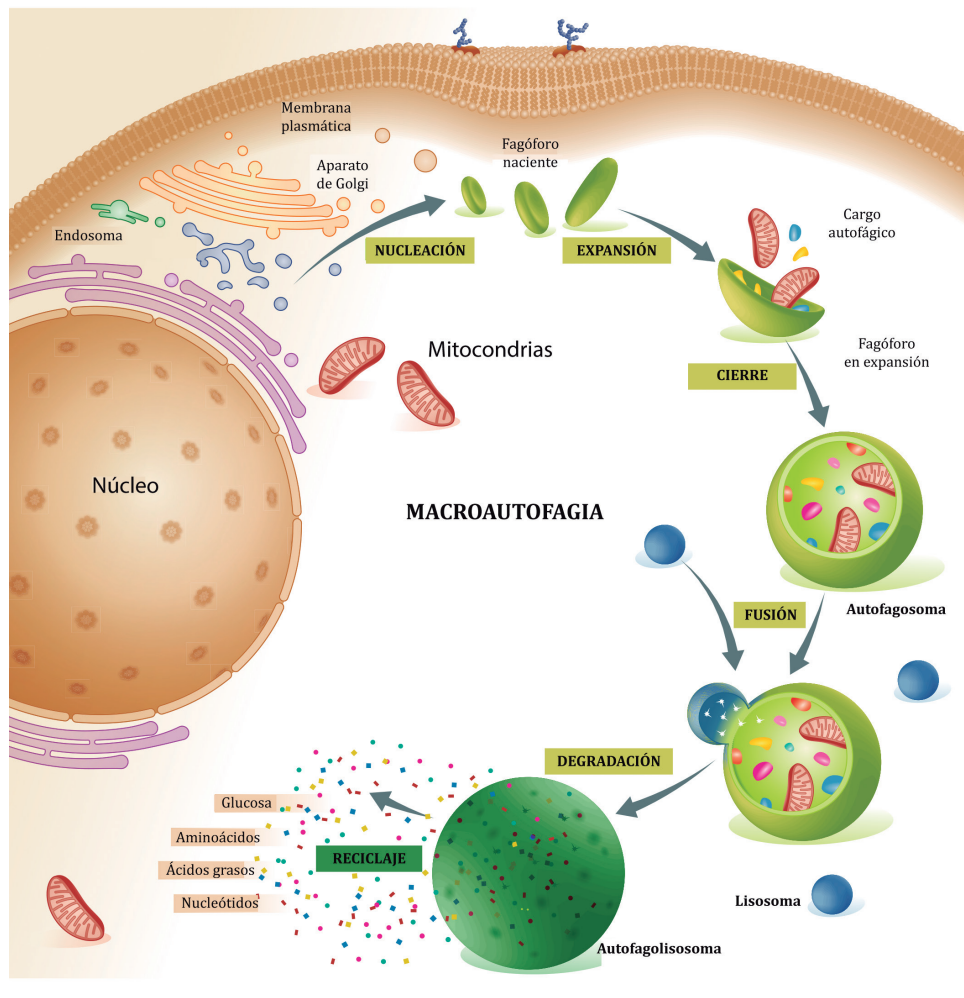


Figura 1.19. Principales etapas de la Macroautofagia. Adaptado de (Galluzzi L *et al.*, 2015).

- **Mitofagia dependiente de Parkina:** El primer tipo de Mitofagia, incluye a la proteína Parkina (ubiquitín ligasa E3) la cual va a ser reclutada desde el citosol para unirse a las mitocondrias despolarizadas gracias a la acción de la serina treonina quinasa PINK1 (quinasa inducida por PTEN 1) (Shirihai OS *et al.*, 2015). En enfermos de Parkinson se han detectado mutaciones en los genes que codifican para Pink1 y Parkina, siendo estas las responsables de la acumulación de mitocondrias dañadas en el cerebro de estos pacientes. En condiciones normales PINK1 va a ser importado a la membrana mitocondrial interna donde será degradada por proteólisis, gracias a la acción de PARL (proteína romboide asociada a presenilina). PARL des-

estabiliza a PINK1 permitiendo su liberación de la membrana mitocondrial interna para poder ser degradada por vía proteasomal (Quirós PM *et al.*, 2015). Cuando las mitocondrias están dañadas y presentan una despolarización de sus membranas, PINK1 va a ser estabilizado en la membrana mitocondrial externa para facilitar el reclutamiento de Parkina (Ashrafi G y Schwarz TL, 2013). Una vez reclutada, Parkina va a ubiquitinar a VDAC (canal de aniones dependiente de voltaje) la cual se une a la proteína adaptadora p62 (SQSTM1, secuestrosoma 1), para facilitar la unión de las mitocondrias a los autofagosomas a través de la proteína LC3 (Zhang Y *et al.*, 2012). Además, Parkina ubiquitina a Mfn 1 y 2 promoviendo su degra-

dación por vía proteasomal, contribuyendo así a la inhibición de la fusión de las mitocondrias despolarizadas (Liesa M y Shirihai OS, 2013) (Figura 1.20).

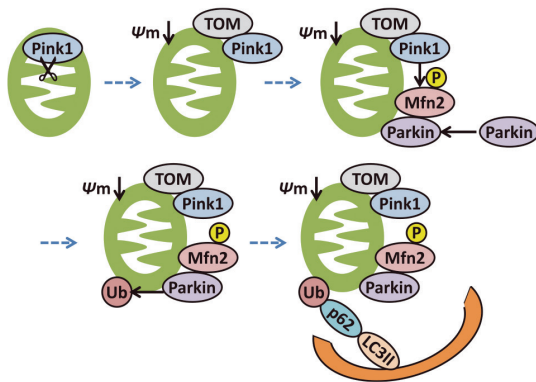


Figura 1.20. Mitofagia dependiente de Parkina de mitocondrias despolarizadas. Adaptado de (Saito T y Shadosima J, 2015).

- **Mitofagia independiente de Parkina:** El segundo tipo de Mitofagia incluye a las proteínas Bnip3 (Proteína 3 de interacción con Bcl2 y proteínas de adenovirus E1B de 19 kDa) y Nix (Bnip3L), proteínas localizada en la membrana externa mitocondrial. Nix se induce en los reticulocitos donde es necesaria para el aclaramiento de las mitocondrias durante el desarrollo de los eritrocitos. (Zhang Y *et al.*, 2012). Además de esta función, se ha visto que Nix también es responsable de la mitofagia inducida por la despolarización de la membrana mitocondrial y de la mitofagia inducida por hipoxia. Una de las principales diferencias con la anterior vía, es que Nix puede interaccionar directamente con LC3 (Figura 1.21), puede inducir la autofagia mediante la disociación del complejo Beclina1-Bcl2 (proteína 2 de leucemia de célula B) y la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Ding WX y Yin XM, 2012).



Figura 1.21. Mitofagia independiente de Parkina mediada por las proteínas Nix y Bnip3. Adaptado de (Saito T y Shadosima J, 2015).

1.2.3 Tejido adiposo *beige*.

En ratones, la exposición al frío prolongada o la estimulación adrenérgica puede provocar la aparición de un conjunto de células UCP1+ con morfología similar a la del adipocito marrón intercaladas entre los depósitos de tejido adiposo blanco (Figura 1.22 A, B) (Kajimura S *et al.*, 2015). Su abundancia varía dramáticamente entre los depósitos de tejido adiposo blanco, encontrándose una mayor proporción de estas células en los depósitos inguinal y retroperitoneal y en mucha menor medida en el depósito perigonadal. Estas células inducibles por distintos estímulos, han sido denominadas como adipocitos *beige* o *brite* (*brown in white cells*) y presentan un patrón de expresión génica que solapa en parte con el presente en los adipocitos marrones. Ambos tipos celulares expresan genes como *Ucp1* y los adipocitos *beige* murinos expresan marcadores de superficie como Cd137 y Tmem26 (Wu J *et al.*, 2012).

Numerosos estudios han observado que el tejido adiposo marrón de los recién nacidos humanos presenta grandes similitudes con el clásico depósito de tejido adiposo marrón de los ratones. Por el contrario, en humanos adultos, existen variaciones en función del depósito, por lo que es posible encontrar células con un fenotipo más similar al adipocito marrón clásico (BAT cervical y suprarrenal) y células más similares a los adipocitos *beige* murinos (BAT supraclavicular). (Rosen ED y Spiegelman BM, 2014; Kajimura S *et al.*, 2015; Shinoda K *et al.*, 2015). Cuando se comparan adipocitos marrones y *beige* se observa que los adipocitos marrones clásicos, presentan unos mayores niveles basales de UCP1 y un mayor porcentaje de respiración desacoplada en comparación con los adipocitos *beige*. (Wu J *et al.*, 2012).

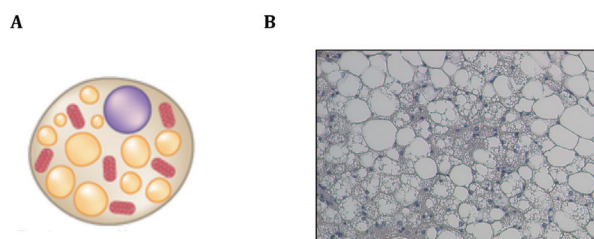


Figura 1.22. Estructura de un adipocito *beige*. **A.** Dibujo esquemático de un adipocito *beige* donde podemos observar el núcleo en posición periférica (morado), disposición multilocular de las vacuolas lipídicas (amarillo) y abundantes mitocondrias (rosa). **B.** Tinción de hematoxilina y eosina de un corte de tejido adiposo blanco inguinal donde se puede observar una zona infiltrada de adipocitos *beige*, aumento 20X.

Durante el proceso de *beiging* va a tener lugar la remodelación del compartimento de WAT en varios sentidos. En primer lugar, la exposición crónica al frío va a promover la angiogénesis, el aumento de la inervación, así como el reclutamiento de eosinófilos, macrófagos y linfocitos T reguladores, que no solo van a controlar las respuestas inflamatorias si no que van a verse implicados en la biogénesis de adipocitos *beige* (Brestoff JR y Artis D, 2015).

En estos últimos años, han sido muchos los grupos de investigación que han tratado de dilucidar el origen de los adipocitos *beige*. En este sentido, en la actualidad existen dos hipótesis: la primera de ellas defendería que los adipocitos *beige* proceden de precursores mesenquimales Myf5- localizados en el WAT los cuales, en respuesta a determinados estímulos externos (frío, agonistas β 3, FGF21, Irisina, etc.) serían capaces de diferenciarse a adipocitos *beige* (Figura 1.8). Por otra parte, existe otra hipótesis que defiende la transdiferenciación de los adipocitos blancos a adipocitos marrones en respuesta a estos estímulos externos (Harms M y Seale P, 2013).

Algunos estudios demuestran que la diferenciación de los adipocitos *beige* tiene lugar a partir de precursores presentes en el músculo y en el WAT (Schulz TJ *et al.*, 2011). Gracias a la utilización de ratones donde los adipocitos blancos estaban marcados con lacZ inducible por doxicilina, se demostró que, en condiciones de exposición al frío los adipocitos *beige* (identificados como adipocitos UCP1+ en el iWAT) generados no aparecían marcados (Wang QA *et al.*, 2013) refutando así, la hipótesis de la transdiferenciación. En este mismo sentido, la eliminación de progenitores de adipocitos blancos en ratones con obesidad inducida por la dieta, ocasionó un aumento en la diferenciación de los adipocitos *beige* e impidió el desarrollo de la obesidad (Daquinag AC *et al.*, 2015). Otros estudios que apoyan esta hipótesis, son los experimentos en los que se demostró la gran importancia del factor PRDM16 en la determinación del programa termogénico en el tejido adiposo subcutáneo (Seale P *et al.*, 2011).

Por otro lado, el grupo de Cinti, es uno de los que principalmente apoyan la hipótesis de la transdiferenciación. Este grupo, defiende la existencia de adipocitos “pauciloculares” los cuales expresan UCP1, pero presentan una

distribución de vacuolas lipídicas intermedia entre adipocito blanco y adipocito marrón, siendo estos la evidencia de la existencia de células en transición entre adipocito blanco y adipocito marrón (Barbatelli G *et al.*, 1993 y 2010; Himms-Hagen J *et al.*, 2000). En este mismo sentido, el grupo de Wolfrum, llevó a cabo experimentos en los cuales demostró que la formación de adipocitos *beige* inducida por la exposición al frío puede ser revertida con 5 semanas de adaptación a 23°C. Por una parte, se observó que los niveles de UCP1 que habían sido aumentados en el iWAT durante la exposición al frío, disminuyeron a niveles indetectables una semana después. Por otra parte, se observó que los adipocitos con fenotipo *beige* inducidos tras la exposición al frío, adquirieron un fenotipo más parecido a los adipocitos blancos cuando los animales fueron mantenidos a 23°C (Rosenwald M *et al.*, 2013).

1.3 INSULINA E IGF1 EN TEJIDO ADIPOSEO MARRÓN.

1.3.1 Insulina e IGF1.

La insulina es una hormona polipeptídica de 52 aminoácidos, descubierta por (Banting *et al.*, 1922). Se sintetiza como preproinsulina en las células β pancreáticas como una única cadena de 86 aminoácidos. Por procesamiento proteolítico se elimina el péptido señal amino-terminal, generando la proinsulina. Posteriormente, la escisión de un fragmento interior de la proinsulina (péptido-C), genera la insulina, con dos cadenas (α y β), unidas por dos puentes disulfuro, y un tercer puente intracatenario en la cadena α .

El factor de crecimiento similar a la insulina (IGF1) o somatomedina A, fue descubierto por (Salmon WD y Daughaday WH, 1957) y se sintetiza principalmente en hígado, pulmón y riñón, aunque puede ser producido en casi todos los tejidos. Así el IGF1, puede ejercer tanto efectos endocrinos como auto-

crinos (Cohick WS y Clemmons DR, 1993). La síntesis hepática, es la principal responsable de los niveles circulantes y se encuentra bajo el control de la hormona de crecimiento (GH) (Macaulay VM, 1992). El IGF1 es sintetizado como un prepropéptido, el cual tras el procesamiento proteolítico de la secuencia líder y el péptido E situado en la región carboxi-terminal dará lugar al IGF1 (Oberbauer AM, 2013). El IGF1, es un polipéptido de 70 aminoácidos que presenta un 49% de homología con la insulina y un 61% de homología con el IGFII (Ulrich A *et al.*, 1986). El IGF1 necesita conjugarse con proteínas de unión a IGFs o (IGFBP) para poder ser liberado a la circulación y aumentar su vida media de 10min (forma libre) a 12 horas (forma conjugada con IGFBPs) (Macaulay VM, 1992). Se ha visto que el IGF1, controla el desarrollo y diferenciación de células de origen mesodérmico y regula la masa celular en varios tejidos controlando tanto el número como el tamaño de las células (Annenkov A, 2009). Debido a su importante papel en el desarrollo, se ha comprobado que existen bajos niveles de IGF1 en la etapa fetal y que estos van aumentando a medida que lo hace la GH. Por el contrario, el IGFII o somatomedina C presenta unos niveles elevados en las etapas fetales disminuyendo sus niveles en la etapa postnatal (Gilmour RS *et al.*, 1988). Además de sus funciones en el crecimiento y en el desarrollo, el IGF1 tiene un potente papel mitogénico en varios tipos de tumores. (Macaulay VM, 1992).

1.3.2 Receptores e isoformas.

Tanto el receptor de insulina (IR) como el de IGF1 (IGF1R) son receptores compuestos por: dos subunidades α (donde se localiza la zona de unión al ligando) y dos subunidades β (donde reside la actividad tirosina quinasas) conectadas por puentes disulfuros, dando lugar a un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$. Ambos receptores, presentan una alta homología

que va desde el 45-65% en sus dominios de unión a ligando hasta el 60-85% en los dominios con actividad tirosina quinasa (Belfiore A *et al.*, 2009). A pesar de la alta homología ambos receptores presentan diferencias en: la especificidad de unión a los ligandos, distribución tisular y en sus funciones biológicas. (Abbot AM *et al.*, 1992). El IR tiene como función principal regular el metabolismo energético mientras que el IGF1R tiene un papel importante en el crecimiento y en el desarrollo. El dominio citoplasmático del IR presenta 13 residuos de tirosina mientras que el IGF1R presenta 15 residuos, de los cuales 7 y 8 son fosforilados respectivamente tras la unión de sus ligandos (Kim JJ y Accili D, 2002). Por otro lado, el receptor de IGFII (IGFIIR) es ligeramente distinto a los dos anteriores, esta formado por una única cadena de unos 250 kDa que no presenta actividad tirosina quinasa. Este receptor únicamente une IGFII, controlando así los niveles circulantes de este factor (Gilmour RS *et al.*, 1988).

Tanto el gen *Ir* como *Igf1r* han evolucionado de un gen ancestral y ambos forman parte de un sistema que ha sido altamente conservado en vertebrados e invertebrados (Belfiore A *et al.*, 2009). El gen que codifica al *Ir* se localiza en el cromosoma 19 y esta formado por 22 exones. El ARN mensajero (ARNm) del receptor de insulina (IR) puede sufrir *splicing* alternativo en el exón 11 (36 pb) dando lugar así a dos posibles isoformas: isoforma A (IR-A) sin el exón 11 y la isoforma B (IR-B) que mantiene dicho exón. El gen que codifica el *Igf1r* se localiza en el cromosoma 15 y esta formado por 21 exones. Este gen no presenta ningún exón homólogo al exón 11 presente en el gen que codifica el *Ir* (Abbot AM *et al.*, 1992).

En individuos adultos IR-A se expresa de manera ubicua, mientras que IR-B se expresa principalmente en hígado y en menor medida en músculo, tejido adiposo y riñón, todos

ellos tejidos diana de la insulina (Moller DE *et al.*, 1989). Sin embargo, IR-A se expresa predominantemente en tejidos fetales y en cáncer (Denley A *et al.*, 2003). Tanto IR-A como IR-B son capaces de formar tanto homodímeros IR-A/IR-A o IR-B/IR-B como heterodímeros IR-A/IR-B. En este sentido, las células que expresan tanto IR como IGF1R pueden presentar receptores híbridos IGF1R/IR-A o IGF1R/IR-B (Figura 1.23).

Es importante tener en cuenta que, aunque insulina, IGF1 e IGFII se pueden unir tanto al receptor de insulina como al de IGF1, lo van a hacer con distintas afinidades. El IGF1R presenta una alta afinidad por el IGF1, seguido por el IGFII y una baja afinidad por la insulina. Mientras que IRA como IRB, presentan una alta afinidad por la insulina (IRA>IRB) seguida del IGFII (IRA>>>IRB) y el IGF1 (Frasca F *et al.*, 1999; Pandini G *et al.*, 2002). En cuanto a los receptores híbridos, se ha visto que presentan una mayor afinidad por el IGF1 seguido del IGFII y en menor medida la insulina (Cohick WS y Clemmons DR, 1993).

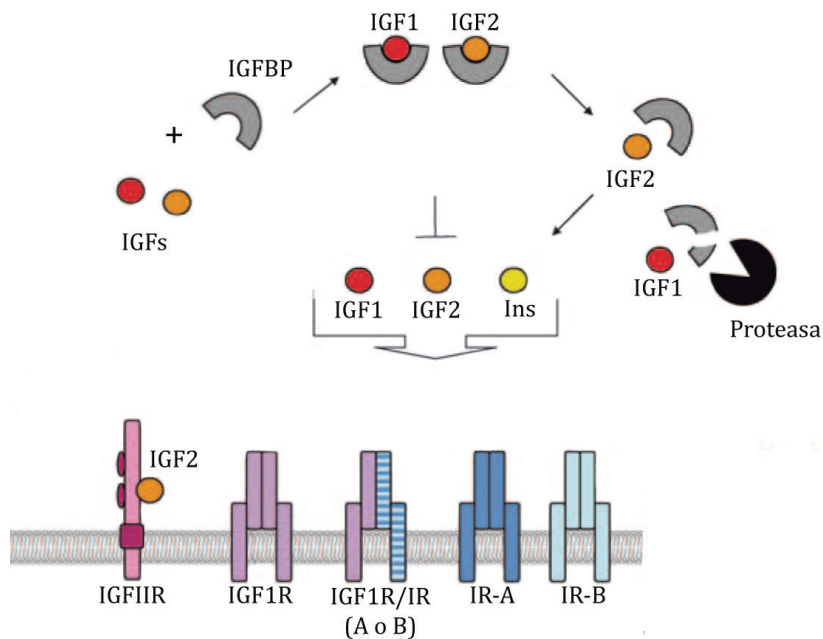


Figura 1.23. Receptores híbridos y sus posibles ligandos. En el esquema se representa como los IGFs necesitan disociarse de las proteínas IGFBPs para poder unirse a sus receptores y también se representan las combinaciones posibles de cadenas $\alpha\beta$ a la hora de formar receptores híbridos. Adaptado de (Massoner P *et al.*, 2010).

1.3.3 Vías de señalización celular.

Cuando la insulina y el IGF1 se unen a sus respectivos receptores o a los receptores híbridos, se va a activar una cascada de señalización que comienza con la autofosforilación de los residuos de tirosina localizados los dominios tirosina quinasa de las cadenas β . Esto va a inducir la fosforilación de las tirosinas localizadas en los dominios yuxtamembrana y en las serinas carboxi-terminales, que constituyen los sitios de unión para otras proteínas como son los sustratos del receptor de insulina (IRS 1-4), proteínas Shc (proteína con dominios de homología Src 2), Gab1 (proteína de unión asociada a Grb2) (Chitnis MM *et al.*, 2008). Dentro de los IRS podemos distinguir varias isoformas que se diferencian en su localización: IRS1 e IRS2 están ampliamente distribuidas, IRS3 se expresa en adipocitos y cerebro e IRS4 se expresa en tejidos embrionarios. Una vez

que los IRS, las proteínas Shc y Gab1 son fosforilados van a servir como punto de anclaje a la subunidad reguladora p85 de la PI3K y a la proteína adaptadora Grb2 (proteína 2 de unión a receptores de crecimiento) (Belfiore A *et al.*, 2009). Estas proteínas tienen como característica, la presencia de dominios SH3, que se van a unir a regiones ricas en prolina de otras proteínas que continuarán la vía de señalización. En este punto podemos distinguir dos vías de señalización principales (Figura 1.24) que van a mediar los efectos metabólicos y/o mitogénicos:

- **Vía de la PI3K/PDK1/Akt:** en esta vía la unión de los IRS con la PI3K va a activar su subunidad catalítica p110 que va a fosforilar al fosfolípido de membrana PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) para generar PIP_3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). En este punto podemos encontrar distintas fosfatasa que pueden actuar sobre el PIP_3 inhibiendo esta

vía, como PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5,- tri-fosfato fosfatasa 3) o SHIP2 (inositol fosfatasa con dominios SH2). El PIP₃, va a reclutar a PDK1 (proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositidos). PDK1 va a fosforilar y activar a serinas/treonina quinasas como Akt (proteína quinasa B) o PKC (proteína quinasa C) (Belfiore A *et al.*, 2009). Existen tres isoformas de la proteína Akt las cuales varían en su distribución: Akt1 se distribuye de manera ubicua, Akt2 predomina en tejidos sensibles a la insulina como el hígado y el tejido adiposo y Akt3 se expresa principalmente en

sistema nervioso y testículos (Taniguchi CM *et al.*, 2006). La activación de Akt requiere la fosforilación en dos residuos: la fosforilación en Thr³⁰⁸ mediada por PDK1 y la fosforilación en Ser⁴⁷³, necesaria para la completa activación de Akt, mediada por mTORC2 (complejo diana de la rapamicina en mamíferos 2) (Yang G *et al.*, 2015).

La activación de Akt regula enzimas metabólicas como GSK3 β la cual es inactivada tras su fosforilación, permitiendo la activación de la glucógeno sintasa (GS) (MacManus EJ *et al.*, 2005). También media el transporte de

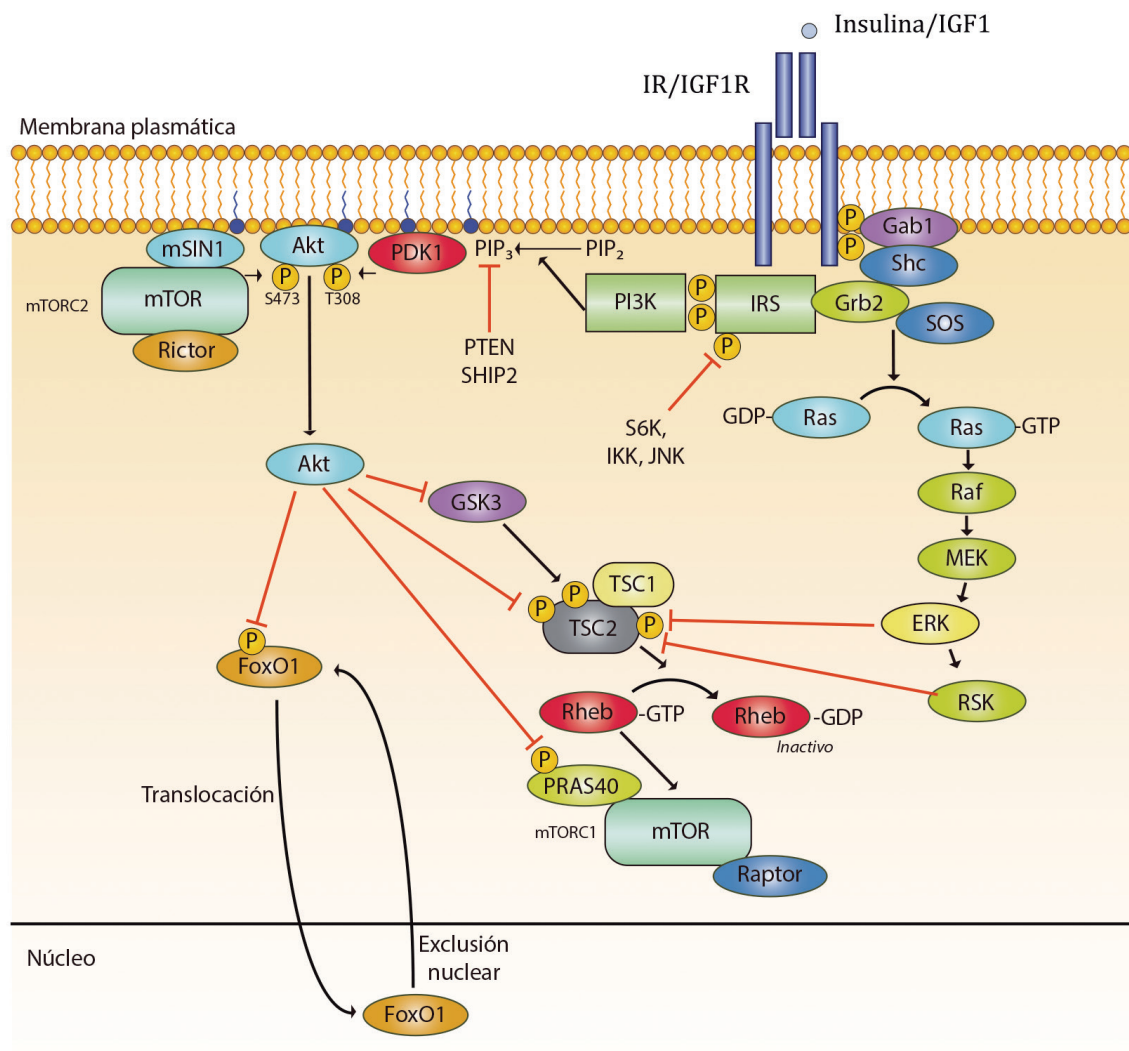


Figura 1.24. Principales vías de señalización de los receptores de insulina e IGF1. Adaptado de (Bartolomé A, 2012).

GLUT4 a la membrana (Leto D y Saltiel AR, 2012), inhibe la gluconeogénesis hepática y activa la adipogénesis mediante la exportación al citoplasma y degradación de FoxO1 (proteína O1 de la familia Forkhead con dominios tipo caja) (Matsuzaki H *et al.*, 2003), inactiva a la proteína BAD (agonista de muerte celular asociado a Bcl2) inhibiendo así su función proapoptótica (Datta SR *et al.*, 1997) e impide la gluconeogénesis y la oxidación de ácidos grasos mediante la fosforilación de PGC1- α (Boucher J *et al.*, 2014).

Otra de las vías activada por PI3K es la vía de mTOR cuya función es regular el metabolismo y el crecimiento celular. Akt es capaz de fosforilar (Ser⁹³⁹ Y Thr¹⁴⁶²) e inactivar al complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2) (Manning BD *et al.*, 2002). Estas fosforilaciones inhiben la función GAP de TSC2, promoviendo la activación de mTORC1. La activación de mTORC1 esta asociada a la activación de la vía p70S6K (proteína quinasa S6 ribosomal de 70 kDa) implicada en la síntesis proteica (Inoki K *et al.*, 2002).

- **Vía Ras-MAPK:** esta vía es activada tras la unión de proteínas con dominios SH2 a los residuos tirosina fosforilados del IR/IGF1R o de los IRS. Dentro de las proteínas con dominios SH2, tenemos a Shc y a la proteína Grb2. El dominio SH3 de Grb2 localizado en la región carboxi-terminal se va a unir a Gab-1, mientras que el dominio SH3 amino-terminal se va a unir a las regiones ricas en prolina de la proteína SOS (del inglés son of sevenless homolog 1). La proteína SOS actúa como un intercambiador de nucleótidos de guanina para la proteína Ras (), catalizando el cambio de Ras-GDP (forma inactiva unida a membrana) a Ras-GTP (forma activa). Ras-GTP interactúa con la serina treonina quinasa Raf la cual estimula a sus dianas MEK1/2 que fosforilan y activan a las MAPK ERK1/2. La activación de ER1/2 van a ejercer un papel en la proliferación, diferenciación y re-

organización del citoesqueleto (Boucher J *et al.*, 2014).

1.3.4 Modelos animales.

Debido a la alta homología que presentan los receptores de insulina e IGF1, a la presencia de receptores híbridos, a la capacidad de sus ligandos para unirse a ambos en función su concentración, a la expresión de ambos receptores en los mismos tipos celulares y a la activación de las mismas vías de señalización, ha sido muy difícil el estudio del papel diferencial de cada uno de los receptores en los distintos tejidos. Por ello la primera aproximación fue generar modelos *knockouts* constitutivos del IGF1R e IR. Debido a su letalidad, desde entonces han sido múltiples los modelos animales que se han generado (Tabla 1.3, 1.4 y 1.5), deleccionando de manera tejido-específica IR, IGF1R o ambos para tratar de esclarecer sus funciones, así como los posibles mecanismos compensatorios que son activados ante la falta de uno u otro receptor.

Modelo	Tejido	Fenotipo	Referencia
IRKO	Constitutivo	Hiperglucemia severa. Muere al nacer por cetoacidosis diabética.	Accili D <i>et al.</i>, 1996
MIRKO	Músculo	Dislipidemia sin diabetes, adipocitos sensibles a insulina.	Bruning JC <i>et al.</i>, 1998
BIRKO	Célula β	Ligera disminución masa célula β , secreción insulina disminuida e intolerancia a la Glucosa.	Kulkarni RN <i>et al.</i>, 1999
NIRKO	SNC	Resistencia insulina. Obesidad inducida por la dieta. Aumento peso corporal y peso WAT, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, aumento leptina. Fertilidad reducida	Bruning JC <i>et al.</i>, 2000
LIRKO	Hígado	Intolerancia a la Glucosa, resistencia a insulina, hiperinsulinemia y aumento de la masa de célula β .	Michael MD <i>et al.</i>, 2000
BATIRKO	BAT	Atrofia BAT asociada a la edad, intolerancia a la Glucosa sin resistencia a la Insulina.	Guerra C <i>et al.</i>, 2001
FIRKO	Tejidos adiposos	Protección frente a la obesidad, aumento de la longevidad. Disminución de la masa grasa y de los niveles de triglicéridos.	Blüher M <i>et al.</i>, 2002

Tabla 1.3 Modelos animales carentes del receptor de insulina.

Modelo	Tejido	Fenotipo	Referencia
IGF1RKO	Consitutivo	Retraso en el crecimiento. Mueren al nacer por fallo respiratorio debido a defectos en el desarrollo del diafragma y los músculos intercostales.	Liu JP <i>et al.</i>, 1993
β Igf1r ^{-/-}	Célula β	Crecimiento y desarrollo normal de la célula β , disminución de Glut2, intolerancia a la glucosa, defecto en la secreción de insulina.	Kulkarni RN <i>et al.</i>, 2002
LIGFREKO	Hígado	Fallo en la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática.	Debois-Mounthan C <i>et al.</i>, 2006
IGF1R ^{aP2Cre}	Tejidos adiposos	Animales más grandes debido al aumento de IGF1 circulante, aumento tejido adiposo epididimal.	Klötting N <i>et al.</i>, 2008
Δ IGF-1R	Músculo	Fallo en el desarrollo muscular, disminución del tamaño y número de miofibrillas.	Mavalli MD <i>et al.</i>, 2010
Cart ^{Igf1r} ^{-/-}	Cartílago	Mueren al nacer por fallos en el desarrollo del cartílago y retraso en la osificación.	Want Y <i>et al.</i>, 2011
Nkx2-1Cre Igf1r ^{fl/fl}	Epitelio pulmonar	Problemas en la diferenciación del epitelio bronqueo-alveolar	López IP <i>et al.</i>, 2016
CIGFIRKO	Corazón	No hipertrofia cardiaca asociada a la edad, disminución de la fibrosis cardiaca.	Ock S <i>et al.</i>, 2016
BATIGFIRKO	BAT	Desarrollo normal BAT, fallo termogénico tras 12h de frío, aumento IGF1 plasmático, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia moderadas y resistencia a la insulina.	Viana-Huete <i>et al.</i>, 2016

Tabla 1.4 Modelos animales carentes del receptor de IGF1.

Modelo	Tejido	Fenotipo	Referencia
betaDKO	Célula β	Hipoplasia célula β , hipoinsulinemia y diabetes severa	Ueki et al., 2006
MI ² RKO	Corazón, músculo	Mueren en el primer mes de vida por fallo cardiaco	Laustsen PG et al., 2007
FIGIRKO	Tejidos adiposos (aP2-Cre)	Disminución masa WAT y BAT (85%), resistencia a la obesidad inducida por la dieta grasa y a la intolerancia a la glucosa inducida por la edad y la dieta grasa, aumento del gasto energético, fallo termogénico en respuesta al frío.	Boucher J et al., 2012
MIGIRKO	Músculo	Pérdida del 60% de la masa muscular, hipoglucemia en el ayuno e incremento en la captación de glucosa basal.	O'Neill RT et al., 2015
F-IR/IGFRKO	Tejidos adiposos (Adiponectin-Cre)	Ausencia de WAT y BAT, fallo termogénico en respuesta al frío, diabetes, acumulación de lípidos ectópica en hígado y músculo e hiperplasia pancreática	Boucher J et al., 2016
BATIGFIRDKO	BAT	Atrofia BAT (85%), aumento de la masa grasa, fallo termogénico en respuesta al frío, resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa, menor número de mitocondrias, más pequeñas y con una disposición de crestas desestructuradas, así como una pérdida de las proteínas implicadas en la mitofagia y en la dinámica mitocondrial	Viana-Huete et al., 2017 (en revisión)

Tabla 1.5 Modelos animales carentes del receptor de insulina y de IGF1.

1.3.5 Importancia del receptor de insulina (IR) y del receptor de IGF1 (IGF1R) en el desarrollo del tejido adiposo marrón.

Estudios realizados con líneas celulares de adipocitos marrones, han permitido averiguar que importancia tienen estos dos receptores durante la diferenciación de los mismos. Así se ha observado que, en los preadipocitos la expresión de IGF1R es mayor que la expresión de IR, mientras que en los adipocitos maduros ocurre lo contrario (Boucher J *et al.*, 2010a).

La insulina actúa como el principal regulador de la captación de glucosa y del metabolismo lipídico en adipocitos maduros, mientras que ambos insulina e IGF1 tienen un papel importante en la diferenciación y supervivencia de los preadipocitos. Además, en estas células la insulina se une principalmente a su receptor, no es capaz de activar receptores híbridos, la activación de IRS1 y de Akt es dependiente de la unión a su receptor mientras que la activación IRS2 y MAPK tendría lugar a través de su interacción con los receptores de IGF1. Por el contrario, el IGF1 es capaz de activar tanto a su receptor como a los receptores híbridos activando tanto a IRS1 como IRS2 y la activación de Akt va a ser dependiente de la presencia de receptores híbridos (Entingh-Pearsall A and Kahn CR, 2004). En relación a la diferenciación, se ha visto que la presencia de IRS1 es esencial para la diferenciación, mientras que el IRS2 juega un papel más importante en la captación de glucosa inducida por insulina. Los preadipocitos marrones IRS1 KO presentan una disminución en la diferenciación y en la acumulación lipídica comparados con células WT, así como una disminución en PPAR γ , UCP1, Glut-4, FAS y c/EBP α (Fasshauer M *et al.*, 2001) mientras que los preadipocitos IRS2 KO presentan una menor traslocación

de Glut4 a la membrana en respuesta a insulina (Fasshauer M *et al.*, 2000). Por otra parte, estudios con preadipocitos fetales procedentes de ratones *knockout* constitutivos para IGF1R, han demostrado que este receptor es esencial para el programa adipogénico y termogénico de los adipocitos marrones durante la etapa fetal (Mur C *et al.*, 2003).

Existen numerosos estudios *in vitro* que estudian el papel de los receptores de insulina e IGF1 en el control de la apoptosis. La privación de suero en cultivos de preadipocitos se ha visto que ocasiona una parada del ciclo celular en las fases G₀/G₁ y además induce la apoptosis. Estas células cuando fueron tratadas con insulina o IGF1 rescataron a los preadipocitos de la apoptosis demostrando así, que la activación de las vías PI3K y MAPK son esenciales para la supervivencia celular inducida por estos factores (Navarro P *et al.*, 1998). El siguiente paso fue comprobar el papel de los IRS en la función anti-apoptótica de la insulina y del IGF1. Para ello se utilizaron preadipocitos marrones carentes de las distintas isoformas de IRS los cuales fueron sometidos a privación de suero como en los experimentos anteriores. Los resultados mostraron que en los preadipocitos privados de suero durante 5h, el IGF1 y la insulina fueron capaces de rescatar a estas células de la apoptosis en un 85% tanto en células WT como en las carentes de IRS. Por el contrario, en los preadipocitos privados durante 16h se observó que el efecto protector del IGF1 y la insulina disminuyó considerablemente en las células carentes de IRS1 (Tseng YH *et al.*, 2002). Dados los resultados observados en los estudios anteriores, cabría esperar que las células IR/IGF1R DKO fueran sensibles a la apoptosis. Sin embargo, estudios llevados a cabo por el grupo del Dr. Kahn han demostrado que preadipocitos marrones DKO son resistentes a la apoptosis inducida por la vía extrínseca y por la vía intrínseca. Esta resistencia a la apoptosis ha sido asociada con la

pérdida de proteínas pro-apoptóticas en las células DKO, como Bax y caspasa-3 y con un aumento de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, XIAP and Flip. En este estudio proponen un modelo en el que se relaciona la activación/inhibición de la apoptosis en función de si los receptores están unidos o no a un ligando. Así pueden darse tres situaciones: 1) cuando los receptores están unidos a sus ligandos, estos son capaces de activar la vía PI3K e inhibir la apoptosis 2) cuando los receptores no están ocupados la apoptosis puede tener lugar en respuesta a la privación de suero, peróxido de hidrógeno, TNF α , etc. 3) Cuando no existen receptores, existe una resistencia a la apoptosis asociada con un aumento de proteínas pro-apoptóticas (Boucher *et al.*, 2010b).

HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS

El sobrepeso y la obesidad se han convertido en un problema de salud pública de primer orden, debido al aumento de su prevalencia tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo. (Ng, M *et al*, 2014). La obesidad es considerada como una enfermedad crónica con consecuencias a nivel sistémico, asociada con frecuencia a otras patologías como hipertensión, enfermedad vascular, diabetes tipo 2, dislipidemia, cáncer y neurodegeneración (Maffort T.T *et al*, 2016). El descubrimiento de la presencia de tejido adiposo marrón metabólicamente activo en humanos adultos (van Marken Lichtenbelt WD *et al*, 2009; Cypess AM *et al*, 2009; Virtanen KA *et al*, 2009) y su ausencia de función en sujetos obesos, han hecho que, en los últimos años, el tejido adiposo marrón sea considerado como una posible diana para el tratamiento de la obesidad. En este sentido, esta tesis tiene como fin contribuir a un mejor conocimiento de los nuevos mecanismos implicados en la termogénesis mediada por el tejido adiposo marrón.

1ª parte

Estudios previos en nuestro laboratorio, identificaron al receptor de insulina (IR) como un receptor clave en la adipogénesis del tejido adiposo marrón y en el mantenimiento de la homeostasis glucídica. Para ello,

se utilizó el “*knockout*” del IR específico de tejido adiposo marrón (BATIRKO). Dicho modelo, presentó una severa lipoatrofia marrón acompañada de un aumento de los niveles de UCP1 y UCP2, así como una intolerancia a la glucosa debido a un defecto en la secreción de insulina (Guerra C *et al*, 2001). Estudios posteriores, demostraron que la atrofia del BAT estaba asociada con un aumento de la masa de tejido adiposo visceral. El resultado global fue el aumento de citoquinas proinflamatorias a nivel sistémico, responsables de desencadenar disfunción endotelial y lesión vascular (Gómez-Hernández A *et al*, 2012). Debido a la gran homología existente entre el receptor de insulina y el de IGF1 (IGF1R) (Belfiore A *et al*, 2009) y a los estudios con preadipocitos marrones fetales carentes del IGF1R que demostraron que dicho receptor era esencial para el desarrollo del programa adipogénico y termogénico (Mur C *et al*, 2003), nos planteamos estudiar el papel del IGF1R en el desarrollo y funcionalidad del BAT así como los efectos de la delección del mismo en la marronización del tejido adiposo y en el estatus metabólico. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivos

Mediante la generación de ratones *knockout* del IGF1R específicos de tejido adiposo marrón (BATIGFIRKO):

1. Estudiar el papel del receptor de IGF1 en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón, así como los mecanismos compensatorios llevados a cabo por el IR y los factores circulantes IGF1, BMP7 y T3.
2. Analizar los efectos de la delección del IGF1R sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal.
3. Establecer el impacto de la carencia del IGF1R sobre el desarrollo y distribución del órgano adiposo, la homeostasis glucídica y el estatus endocrino en el modelo BATIGFIRKO.
4. Estudiar los efectos de la delección del IGF1R sobre las proteínas desacoplantes de tejidos periféricos y su papel protector frente a la dieta grasa.

2ª parte

En 2012, el grupo de C.R Kahn generó el primer modelo animal sin los receptores IGF1R/IR en el órgano adiposo (blanco y marrón) gracias a la acción de la recombinasa Cre bajo el promotor del gen *aP2*. Este modelo presentó una disminución considerable de la masa de tejido adiposo blanco y marrón, un defecto termogénico tras la exposición al frío, resistencia a la obesidad inducida por la dieta y protección frente a la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta y por la edad (Boucher J *et al*, 2012). Años más tarde, el mismo grupo generó tres modelos diferentes: sin IR, sin IGF1R o sin ambos receptores, pero en esta ocasión utilizando una recombinasa Cre bajo la acción del promotor del gen de la adiponectina. En este caso, los animales doble “*knockout*” (DKO) presentaron una ausencia total de BAT y WAT, diabetes severa, acumulación ectópica de lípidos en el hígado y músculo e hiperplasia pancreática (Boucher J *et al*, 2016). Además, demostraron que la ausencia del IR fue suficiente para alterar la formación del tejido adiposo y la correcta funcionalidad del BAT, mientras que la del IGF1R solo tuvo una contribución

menor. Con el fin de estudiar el papel de ambos receptores en el tejido adiposo marrón de manera específica, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos

Mediante la generación de ratones IR/IGF1R doble “*knockout*” específicos de tejido adiposo marrón (BATIGFIRDKO):

5. Estudiar los efectos de la delección de ambos receptores en el desarrollo y en la función termogénica del tejido adiposo marrón y sus efectos sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal.
6. Analizar cómo estos receptores contribuyen a la mitocondriogénesis, a la dinámica mitocondrial y a los procesos de mitofagia del tejido adiposo marrón y estudiar la contribución de dichos procesos a la termogénesis marrón.
7. Estudiar el papel de estos receptores en el desarrollo y distribución del órgano adiposo, la homeostasis glucídica y el estatus endocrino en el modelo BATIGFIRDKO.

3ª parte

Evidencias aportadas por el grupo del Dr. Shirihai han demostrado que tras la estimulación adrenérgica del BAT, los procesos de dinámica mitocondrial actúan como un regulador fisiológico de los cambios en el gasto energético (Wikstrom JD *et al*, 2014). El gran número de mitocondrias presentes en el tejido adiposo marrón (Frontini A y Cinti S, 2010), hacen de este tejido un candidato único para el estudio de los mecanismos de dinámica y de control de calidad mitocondriales, esenciales para el mantenimiento de una población de mitocondrias funcionales. (Mishra P y Chan DC, 2016). Por ello, nos propusimos estudiar la contribución del IR y del IGF1R en dichos procesos, mediante el planteamiento de los siguientes objetivos:

Objetivos

Mediante la generación de líneas celulares de preadipocitos marrones IR/IGF1R DKO:

8. Estudiar los procesos de mitofagia y dinámica mitocondrial.

9. Estudiar como la ausencia de estos receptores afectan a la funcionalidad de los adipocitos marrones en relación a la respiración y el potencial de membrana mitocondrial.

MATERIALES Y

MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.

3.1.1 Modelos animales.

Para la realización de esta tesis se utilizaron distintos modelos animales. En primer lugar, con el fin de analizar el papel del receptor de IGF1 en tejido adiposo marrón, se generaron ratones BATIGIRKO, los cuales presentaban una delección específica del IGF1R en el tejido adiposo marrón. Para este fin, se utilizó el sistema *Cre* recombinasa derivado del bacteriófago P1 (Abremski K y Hoess R, 1983). Este sistema permite la escisión de regiones del genoma flanqueadas por secuencias *loxP* gracias a la acción de la *Cre* recombinasa, enzima que puede ser expresada bajo promotores específicos de tejido, permitiéndonos así, deleccionar una región génica de manera tejido-específica (Sauer B y Henderson N, 1988).

El modelo BATIGIRKO fue generado mediante el cruce de animales *Igf1r*^{loxP/loxP}, cedidos por el grupo de C.R Kahn, con fondo genético mixto (129/Sv, C57Bl/6) que presentaban el exón 3 del gen del receptor de IGF1 flanqueado por secuencias *loxP* (Kulkarni RN *et al.*, 2002) con animales que expresaban la *Cre* recombinasa bajo el promotor de *Ucp1* (Guerra C *et al.*, 2001). Para

ello se cruzaron machos *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ucp1-Cre*^{-/-} con hembras *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ucp1-Cre*^{+/-} obteniéndose un 50% de animales control *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ucp1-Cre*^{-/-} y un 50% de animales BATIGIRKO según las leyes mendelianas.

Por otro lado, para estudiar los posibles efectos compensatorios que podrían estar teniendo lugar en el tejido adiposo marrón ante la ausencia del receptor de insulina y de IGF1, se generó el modelo BATIGIRDKO con fondo genético mixto (129/Sv, C57Bl/6) mediante el cruce de machos *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ir*^{loxP/loxP}, *Ucp1-Cre*^{-/-} (los cuales presentan el exón 3 del *Igf1r* y el exón 4 del *Ir* flanqueados por secuencias *loxP*) con hembras *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ir*^{loxP/loxP}, *Ucp1-Cre*^{+/-} obteniéndose un 50% de animales control *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ir*^{loxP/loxP}, *Ucp1-Cre*^{-/-} y un 50% animales DKO.

Para la realización de los estudios contenidos en esta tesis, solo se utilizaron ratones macho. Todos los animales fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12h, con alimentación y bebida *ad libitum* desde su destete (aproximadamente a los 21 días). El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante el análisis de animales centinelas. Todo el trabajo descrito en la presente tesis doctoral se realizó según las normas del Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid.

3.1.2 Dietas.

A lo largo de esta tesis los distintos modelos animales fueron alimentados con distintas dietas en función de las necesidades de los distintos estudios. En condiciones normales en el animalario, los animales tras el destete a las tres semanas son alimentados con una dieta estándar A04 en la cual el 3% de las calorías provienen de la grasa.

En el caso del modelo BATIGFIRKO, tras el destete, los animales fueron alimentados durante 16 semanas con dieta estándar o con una dieta grasa no obesogénica con la siguiente composición: 18.4% Kcal proceden de las proteínas, 21.3% Kcal de los carbohidratos y 60.3% Kcal de la grasa. Además, esta dieta contiene una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (araquidónico, linoleico, linolénico) en comparación con el contenido de ácidos grasos saturados y grasas trans (Panlab, Barcelona).

Por otro lado, el modelo BATIGFIRDKO, tras el destete, fue alimentado durante 8 semanas con una dieta grasa con la siguiente composición: 63% Kcal procedentes de la grasa, 21.4% de los carbohidratos y un 18.3% de las proteínas (Envigo, Cambridge, UK).

En ambos modelos animales, durante la duración de la dieta los animales fueron pesados cada semana y se llevó a cabo un control de la ingesta.

3.1.3 Genotipaje.

Para el genotipaje de los animales, se procedió a extraer ADN genómico a partir de un fragmento de cola de ratón. Los fragmentos se incubaron con 300 μ L de un tampón compuesto por [Tris-HCl 10 mM, EDTA 100 mM, SDS 0.5 % (p/v), pH 7.4] y proteinasa K a 20 mg/mL (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) durante toda la noche a 55 °C. Al día siguiente, se extrajo el ADN con 300 μ L de una mezcla de fenol, cloroformo e isoamilalcohol (25:24:1) y, tras *vortex* intenso seguido de centrifugación (4 °C, 10 min, 15,000 $\times g$), se recogió la fracción superior. El ADN se precipitó por adición de 500 μ L de etanol absoluto y se centrifugó en dos pasos (5 min, 15,000 $\times g$, 4 °C). El precipitado se dejó secar durante 5 min. A continuación, se resuspendió en 300 μ L de ddH₂O calentada a 65 °C. El genotipaje de los animales se realizó mediante PCR (ver sección 3.3.3, [Figura 3.1](#)) con 1 μ L de la solución anterior utilizando los siguientes *primers* y condiciones ([Tabla 3.1](#)).

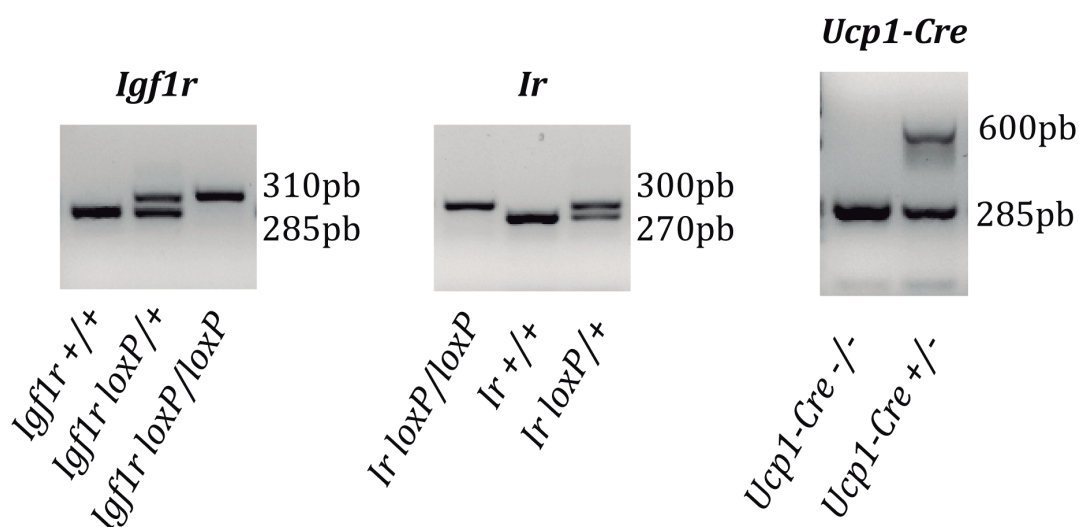


Figura 3.1. Ejemplo representativo de los resultados obtenidos tras la realización de las PCRs necesarias para el genotipaje de los animales.

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (Tm y ciclos)
<i>Ucp1-Cre</i>	S: 5'-GTCTGCACTGGCACTACCTA-3'		
	AS: 5'-GGAGAAGCCTCATCAATGTCA-3'	Cre + 600pb WT 285pb	60°C, 30 ciclos
	AS (Cre): 5'-CCATCGCTCGACCAGTTTAGT-3'		
<i>Igf1r</i>	S: 5'-ATGAATGCTGGTGAGGGTTGTCTT-3'	loxP/loxP 310pb	60°C, 34 ciclos
	AS: 5'-ATCTTGGAGTGGTGGGTCTGTTTC-3'	WT 250pb	
<i>Ir</i>	S: 5'-CTGAATAGCTGAGACCACAG-3'	loxP/loxP 300pb	57°C, 34 ciclos
	AS: 5'-GATGTGCACCCCATGTCTG-3'	WT 270pb	

Tabla 3.1 Primers utilizados para el genotipaje de los animales.

3.1.4 Test metabólicos *in vivo*.

3.1.4.1 Test de tolerancia a glucosa (GTT).

Previamente a la realización del test, los animales fueron ayunados el día anterior, durante unas 16 h aproximadamente. Al día siguiente, se midió la glucemia en ayunas (tiempo 0) a partir de la sangre extraída de la vena de la cola y se les administró, por inyección intraperitoneal, una dosis de glucosa de 2 g/kg de peso. Los niveles de glucosa en sangre se midieron a los 30, 60 y 120 min después de la inyección utilizando un glucómetro y tiras reactivas para la medición de la glucemia de Accu-Check (Roche, Penzberg, Germany).

3.1.4.2 Test de tolerancia a insulina (ITT).

Este test se realizó en animales sin ayunar y normalmente sobre la misma hora (entre 10-11 am). Tras medir la glucemia en ayunas (tiempo 0) se les administró, por inyección

intraperitoneal, una dosis de insulina (Humulin regular, Eli Lilly, Indianapolis, IN) de 1 U/kg de peso. Al igual que en el test anterior, se midió la glucosa de la sangre procedente de la vena de la cola, a los 15, 30 y 60 min después de la inyección con los mismos medios que fueron utilizados en el test anterior. Los resultados de las ITT se representaron como porcentaje respecto a la concentración de glucosa inicial en sangre.

3.1.4.3 Test de secreción de insulina.

Este test fue realizado comprobar si existía una correcta secreción de insulina. Para ello, a animales ayunados al igual que en el caso de la GTT, se les midió la glucemia en ayunas y se les extrajo sangre de la vena de la cola mediante el procedimiento descrito en el siguiente apartado (tiempo 0). A continuación, se les administró, por inyección intraperitoneal, una dosis de glucosa de 3g/kg peso. A los 5, 10, 20, 40 y 60 minutos después de la inyección, se midieron los niveles de gluco-

sa y al igual que a tiempo 0, se recogió una muestra de sangre. Para el análisis de los resultados de este test, las distintas muestras fueron sometidas al protocolo descrito en el siguiente apartado para la obtención del plasma sanguíneo y a continuación se valoraron los niveles de insulina mediante la utilización de un kit de ELISA (ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzimas) de insulina (*ver sección 3.6.1*)

3.1.4.4 Obtención de plasma sanguíneo.

Para la obtención del plasma, la sangre se extrajo tras anestesiarse animales alimentados antes de su sacrificio. Para ello se utilizó una jeringuilla ligeramente bañada en enoxaparina sódica 60 mg (6000 UI) para evitar la coagulación o en el caso de los test de secreción de insulina, la sangre se extrajo de la cola del ratón a un tubo ependorf también ligeramente bañado en enoxaparina sódica. La sangre se dejó sedimentar por gravedad en hielo durante 30 min y, posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm (con deceleración sin freno) durante 10 min y a 4 °C. Todos los plasmas obtenidos fueron conservados a -20 °C hasta su utilización, evitando en la medida de lo posible la congelación y descongelación continuada.

3.1.5 Test de exposición al frío.

La finalidad de este ensayo es estudiar la capacidad termogénica del BAT. Previamente al ensayo, los animales fueron puestos a termoneutralidad (28-30 °C) durante tres días. Este paso previo, debe realizarse siempre que se quiera estudiar la termogénesis, puesto que bajo las condiciones de temperatura habituales en los animalarios (23 °C) la proteína UCP1 se encuentra activa y los resultados podrían ser malinterpretados. Tras el periodo de termoneutralidad, se tomó la temperatura basal de los animales y posteriormente, los animales fueron expuestos

durante 12 h a temperaturas de entre 4 y 6 °C. Durante este tiempo se midió la temperatura rectal mediante la utilización de un termómetro con sonda rectal (BIO-9882 Dual Input Thermometer de Bioseb (Vitrolles, Francia). Todos los experimentos se comenzaron a la misma hora (9am) con disposición de alimento y bebida *ad libitum*.

3.1.6 Medida del volumen de grasa corporal mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

Estos experimentos fueron realizados en el CAI de Resonancia Magnética Nuclear localizado en el Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid. Para la realización de estos estudios, los animales fueron anestesiados con isoflurano y se monitorizó su respiración durante la duración del ensayo. La grasa corporal fue medida utilizando el equipo de Resonancia Magnética Bruker BIOSPEC 47/40 (Ettlingen, Alemania). Las imágenes fueron obtenidas como cortes longitudinales de los animales y fueron analizadas posteriormente, utilizando el *software* Image J Launcher 1.46 (*ver sección 3.7.1.1*).

3.1.7 Medida del gasto energético mediante jaulas metabólicas.

Estos estudios se realizaron en la plataforma de jaulas metabólicas LabMaster, de TSE Systems (Bad Homburg, Alemania) ubicada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols. Antes de la realización de estos estudios, los animales fueron mantenidos en estas nuevas jaulas para facilitar su adaptación al nuevo entorno y a los sistemas de dispensación de comida y bebida. Las jaulas metabólicas permiten la determinación de diferentes parámetros como son: RER (tasa de intercambio respiratorio), VO_2 (volumen de oxígeno consumido), VCO_2 (volumen de

dióxido de carbono producido), consumo de comida y bebida, temperatura (calor generado en la jaula) y la medida de la actividad física de los animales. Durante las siguientes 72h posteriores al periodo de adaptación se tomaron datos cada 10min, los cuales posteriormente fueron analizados utilizando el *software* PhenoMaster.

3.1.8 Medida de la captación de glucosa en el BAT mediante Tomografía de emisión de positrones-Tomografía computerizada (PET/CT).

Estos estudios fueron realizados en el Centro de Cartografía Cerebral de la Universidad Complutense de Madrid. Para medir la captación de glucosa en el BAT, los animales fueron anestesiados con isoflurano y posteriormente fueron inyectados intraperitonealmente con 11,1 MBq del radiotrazador 18F-FDG ([18F]-2-fluor-D-2-deoxy-D-glucosa). A continuación, se midió la captación de glucosa radioactiva tanto a temperatura ambiente (26 °C) como a 4 °C y se tomaron distintas imágenes de PET y CT con el escáner híbrido PET/CT de Oncovision (Valencia). Los resultados fueron analizados con el *software* PMOD versión 3.0 (Pmod Technologies, Zurich, Suecia) y representados como el valor estándar de captación (SUV).

3.1.9 Experimentos de señalización de insulina *in vivo*.

Para comprobar la posible existencia de resistencia a la insulina en los distintos tejidos del animal, animales en estado de alimentación (dieta estándar o dieta grasa) fueron inyectados intraperitonealmente con 1 U/kg de peso de insulina (Humulin regular, Eli Lilly, Indianapolis, IN). Tras 15 minutos, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se procedió a la extracción de los órganos de interés en el orden indi-

cado: hígado, páncreas, BAT, músculo, corazón y tejidos adiposos (iWAT, eWAT, rWAT y mWAT). Inmediatamente tras la extracción, los tejidos fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C hasta su posterior utilización.

3.1.10 Sacrificio de animales de experimentación.

En todos los experimentos llevados a cabo en esta tesis, los animales fueron sacrificados en condiciones de alimentación. El método de sacrificio fue seleccionado en función del experimento a realizar. Así, tanto en los experimentos del frío como en los de señalización de insulina, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. En el resto de ocasiones, debido a que se quería recoger un gran volumen de sangre, los animales se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de 2,2,2-tribromoetanol en 2-metil-2-butanol y dH₂O 1:40 (Sigma-Aldrich) y tras comprobar la ausencia de reflejo podal, se extrajo la sangre de la vena yugular. Tras el sacrificio, los animales se desinfectaron con etanol 70% (v/v) y se realizó una incisión en forma de "V" desde el abdomen inferior extendiéndose hacia las porciones laterales del diafragma, con objeto de exponer todos los órganos de la cavidad peritoneal. Los órganos recogidos se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenados a -80 °C hasta su posterior utilización. En algunos casos fragmentos de distintos tejidos fueron depositados en formalina 10% para su posterior inclusión en parafina o en Tissue-Tek® en el caso de los tejidos que fueron ultracongelados para cuantificar el contenido lipídico mediante tinción con Oil Red O.

3.2 CULTIVOS CELULARES.

3.2.1 Generación de líneas celulares de preadipocitos marrones WT y DKO.

Para el establecimiento de las distintas líneas celulares (Figura 3.2), se utilizaron ratones neonatos *Igf1r^{loxP/loxP}*, *Irf^{loxP/loxP}* de aproximadamente 2-3 días de vida. Tras su sacrificio, los animales se desinfectaron con etanol 70% (v/v) y se procedió a la extracción del BAT interescapular. Todo el procedimiento se realizó con material previamente autoclavado y dentro de una cabina de flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad.

Una vez extraídos, los BAT fueron depositados en placas Petri con PBS frío para mantener el tejido hasta el momento de su procesamiento. Posteriormente, se juntaron todos los BAT y se trocearon finamente con unas tijeras curvas. Los trozos resultantes se pusieron en un falcon de 15ml que contenía unos 5ml de medio de aislamiento (ver composición en Tabla 3.2) precalentado a 37 °C al cual se le había añadido previamente Colagenasa A (1,5mg/ml). A continuación, se incubaron los distintos falcon en un baño de agua a 37 °C con una agitación lineal de 90-100 oscilaciones/min durante un tiempo máximo de 45min. En el transcurso de este tiempo, cada 5 min los falcon fueron agitados vigorosamente en un vortex para facilitar la digestión del tejido.

Trascurridos los 45 min, la mezcla resultante de la digestión se pasó por un *cell strainer* de 100µm de poro con el fin de eliminar los restos de tejido no digerido. El homogenizado resultante, se centrifugó a 1500 rpm durante 5min. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en tampón de lisis (para eliminar los eritrocitos presentes en la muestra, ver composición en Tabla 3.2), se dejó 5min a temperatura ambiente y se vol-

vió a centrifugar a 1500 rpm durante 5min. El precipitado resultante, se resuspendió en medio de aislamiento y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que en los casos anteriores. Finalmente, el precipitado se resuspendió en DMEM (4,5g/l glucosa, 20%FBS, Hepes 20mM, penicilina 120µg/ml, estreptomicina 100µg/ml). A continuación, se contaron las células y se sembraron en placas de 12 pocillos.

Seguidamente, se procedió a la inmortalización por el método previamente descrito en otras líneas (Benito M *et al.*, 1993). Para ello se llevó a cabo la infección con partículas virales codificando para el brazo largo del antígeno T (LTag) de SV40 (DeCaprio JA *et al.*, 1988) obtenidas mediante transfección de células empaquetadoras Phoenix con el plásmido pBABE-puro-LTag (forma K1 mutante, E107K) amablemente cedido por el Dr. J. de Caprio (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EE.UU.). La proteína LTag, proporciona a las células la capacidad de propagarse indefinidamente, así como una inhibición del crecimiento por contacto tras alcanzar la confluencia. Además, el antígeno T tiene la peculiaridad de secuestrar únicamente a p53 y no a Retinoblastoma evitando de esta manera la posibilidad de aparición de fenotipos transformantes (Gjoerup O *et al.*, 2000).

Tras 72h de infección, se retiró el medio que contenía los virus y se procedió a la división y replaqueo de las células cuando fue necesario. Posteriormente, se inició el proceso de selección de células que han incorporado la construcción retroviral, mediante la adición de 1µg/ml de Puomicina (antibiótico al que confiere resistencia la construcción) al medio de cultivo durante 3 semanas. Tras el proceso de inmortalización, se chequeó la existencia de contaminación por *Mycoplasma sp.* (ver sección 3.2.2.4) y se comprobó por *western blot* la presencia de las proteínas p53 y AgT que son indicativo de una correcta inmortalización.

Con el fin de deletar ambos receptores y generar una línea celular DKO, se procedió a la infección de la línea celular generada, con Adenovirus que contienen recombinasa Cre (Vector Biolabs, #1045, título 1×10^{10} PFU/ml) utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 500. Los virus fueron añadidos en combinación con $8 \mu\text{g/ml}$ de Sequabreno (Sigma, S2667) para facilitar la entrada del virus a las células. Tras 48 horas de infección, se retiró el medio con los virus y se sustituyó por medio de cultivo. Al día siguiente, se procedió a realizar el subclonaje de las células. Durante este tiempo se fueron amplificando los distintos clones hasta llegar a llenar va-

rias placas Petri P100 por cada clon.

Para corroborar la delección de los receptores, se chequeó mediante *western blot* los niveles de proteína de IR e IGF1R y también se comprobó la delección mediante RT-PCR (ver sección 3.3.2). De manera adicional, para corroborar que las líneas celulares generadas eran preadipocitos marrones, tras el chequeo de los receptores, se probó a diferenciar tanto las células *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Ir*^{loxP/loxP} (las cuales llamaremos WT de aquí en adelante) como las DKO, para comprobar si efectivamente eran capaces de generar adipocitos marrones maduros (ver sección 3.2.3).

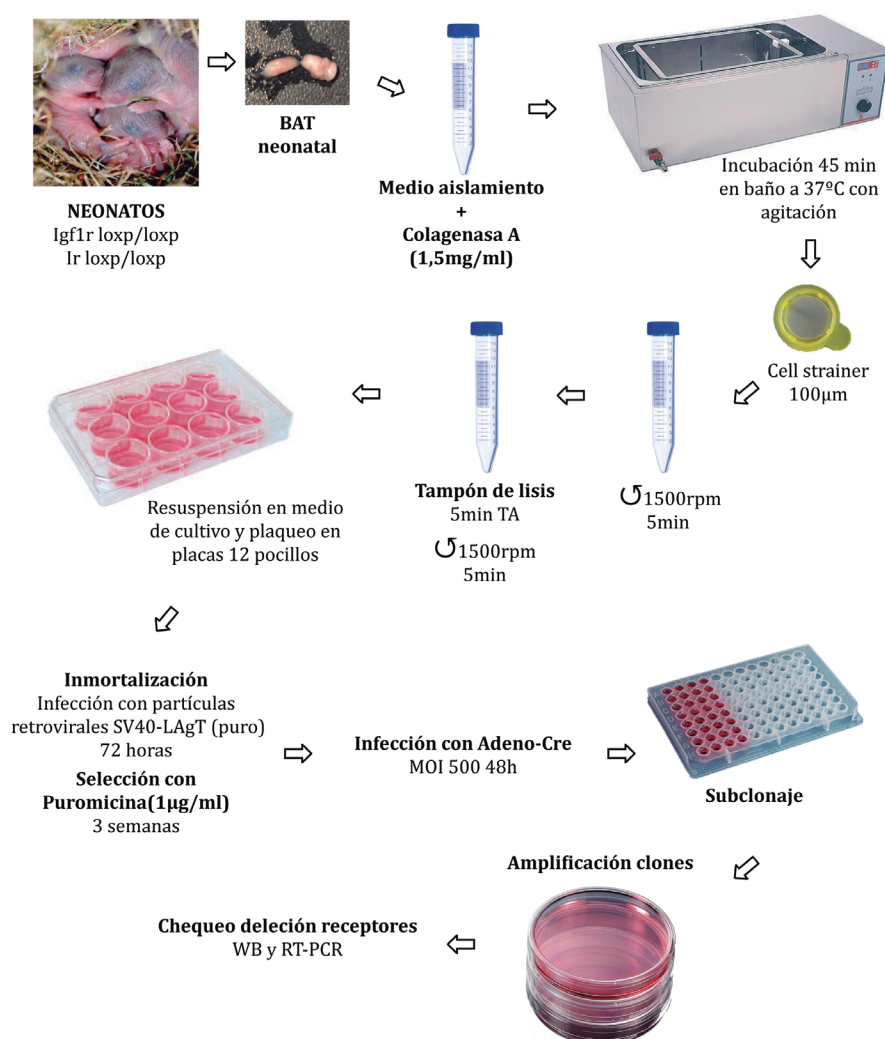


Figura 3.2. Esquema donde se resumen los principales pasos llevados a cabo para la generación de las líneas celulares de preadipocitos marrones WT e IR/IGF1R DKO.

MEDIO AISLAMIENTO		TAMPÓN LISIS
NaCl 123mM	Glucosa 5mM	CIN ₄ 0,154M
KCl 5mM	Penicilina 12μg/ml	KHCO ₃ 10nM
CaCl ₂ 1,3mM	Estreptomicina 10μg/ml	EDTA 0,1mM
Hepes 100mM	Gentamicina 5μg/ml	
BSA 4% (p/v)		
pH 7,4; esterilizar por filtración		pH 7,4; filtrar.
Añadir Colagenasa A (1,5mg/ml)		Conservar a 4°C

Tabla 3.2 Composición medio aislamiento y tampón de lisis de eritrocitos.

3.2.2 Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación.

3.2.2.1 Medio y condiciones de cultivo.

Las células se cultivaron en placas de poliestireno de 10 cm de diámetro tratadas para el cultivo (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE. UU) y se mantuvieron en un incubador a 37 °C en una atmósfera controlada con alta humedad y CO₂ al 5 %.

Para el correcto mantenimiento de las células, cuando alcanzaron una densidad adecuada (entre 70-80%) se realizó una división de las placas. Para ello, tras retirar el medio

de cultivo (ver composición [Tabla 3.3](#)), se realizaron dos lavados con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4) y se incubaron con una solución de tripsina 0.25 % y EDTA 0,02 % en PBS. La tripsina es una enzima que rompe las uniones entre las células y la superficie de la placa de cultivo, así como las uniones entre células. La digestión se paró mediante la adición de medio completo con suero tras lo cual se disgregaron las células y se replaquearon a una densidad adecuada para su correcto mantenimiento. El subcultivo se realizó dos veces por semana.

MEDIO MANTENIMIENTO
DMEM (4,5g/l Glucosa, L-Glutamina de Invitrogen, California, EE.UU.)
10% suero bovino fetal (FBS)
20mM Hepes
Penicilina 12μg/ml, Estreptomicina 10μg/ml
Mycozap® (Lonza)

Tabla 3.3 Composición medio mantenimiento.

3.2.2.2 Congelación, criopreservación y descongelación de líneas celulares.

Para la congelación de las líneas celulares en primer lugar, se tripsinizaron las células y tras parar la reacción, se centrifugaron 1500 rpm 5min. El pellet resultante se resuspendió en medio de congelación: FBS+10% v/v de dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich, Misuri, EE.UU.) y se introdujeron en criotubos debidamente etiquetados (Thermo Fisher, Waltham, EE.UU.)

El proceso de congelación fue llevado a cabo enfriando desde T^a ambiente hasta -80 °C a un ritmo de -1 °C/min. Para ello, los criotubos se colocaron sobre un soporte de polietileno bañado por isopropanol (Mr. Frosty, Thermo Fisher) que fue introducido en un congelador a -80 °C. Las células así congeladas pudieron mantenerse a -80 °C durante meses. Para periodos más largos, los criotubos se trasladaron a un tanque de nitrógeno líquido (-190 °C). La descongelación fue realizada de forma rápida, pasando los viales directamente de -80 °C o nitrógeno líquido a un baño a 37 °C, con agitación manual. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo suplementado con FBS al 10 %.

3.2.2.3 Condiciones de experimentación.

Previamente a cada uno de los experimentos llevados a cabo, el día anterior al experimento las células se contaron y se sembraron

para asegurar que todos los experimentos fueran realizados bajo las mismas condiciones. En los experimentos donde se estimuló la mitofagia con CCCP (Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona, Sigma-Aldrich) y CQ (cloroquina; difosfato (N'-(7-cloroquinolil-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina, Sigma-Aldrich) (*ver características en sección 3.8.2*) fueron realizados con medio completo. Para ello previamente se determinó la dosis óptima de ambos compuestos mediante la realización de una curva de dosis-respuesta, siendo 20µm la concentración óptima para ambos compuestos. En los experimentos llevados a cabo se utilizó CCCP 20µm durante 4, 15 o 24 horas y solo en algunos casos el CCCP se utilizó en combinación con CQ.

3.2.2.4 Chequeo de la existencia de *Mycoplasma sp.*

Los efectos de la contaminación por *Mycoplasma sp.* en las líneas celulares sigue siendo uno de los mayores problemas encontrados en investigación con cultivos celulares. Esta contaminación puede producir grandes cambios en los cultivos que infecta ([Russell WC et al., 1975](#)). Por ello, de manera periódica se chequeó la presencia de *Mycoplasma sp.* tras la descongelación y, de forma rutinaria, 1 ó 2 veces al mes. Para ello, el sobrenadante de células cultivadas durante al menos 48 h se recogió y analizó por PCR para comprobar la presencia de una secuencia específica de *Mycoplasma sp.* utilizando los siguientes primers y condiciones ([Tabla 3.4](#)).

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (Tm y ciclos)
<i>Mycoplasma sp.</i>	S: 5'-GGCGAATGGGTGAGTAACACG-3'	Myc +	60°C, 30 ciclos
	AS: 5'-CGGATAACGCTTGCGACCTATG-3'	500pb	

Tabla 3.4 Primers utilizados para el chequeo rutinario de *Mycoplasma sp.*

3.2.3 Protocolo de diferenciación.

Uno de los métodos más comunes para comprobar si realmente se ha generado una línea celular de preadipocitos marrones es comprobar si son capaces de diferenciar. Esta problemática, viene del hecho de que los preadipocitos marrones tienen una morfología fibroblástica por lo que es imposible distinguir visualmente si nuestro cultivo está contaminado con fibroblastos.

Para llevar a cabo los experimentos de diferenciación, se sembraron células en placas de 6cm de diámetro en medio de diferenciación (*ver composición en Tabla 3.5; sección*

3.8.2), cuando alcanzaron una confluencia del 70-80 % se les añadió el medio de inducción (*ver composición en Tabla 3.6; sección 3.8.2*) el cual se mantuvo durante dos días. Posteriormente, tras los días con el medio de inducción se volvió a utilizar el medio de diferenciación hasta la finalización del proceso entre el día 7 y el día 10. El medio de diferenciación fue renovado cada dos días (*Figura 3.3*). Durante todo el proceso de diferenciación se realizó un chequeo al microscopio donde se comprobó como las células iban presentando una disposición de lípidos multilocular y como la forma fibroblástica se iba perdiendo para dar lugar a una forma más redondeada.

MEDIO DIFERENCIACIÓN

DMEM (4,5g/l Glucosa, 10%FBS, 20mM Hepes, AB, Mycozap®)

T3 1nM(Sigma-Aldrich)

Insulina 20nM

Tabla 3.5 Composición del medio de diferenciación.

MEDIO INDUCCIÓN

Medio de diferenciación

Dexametasona 0,5μM

IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 0,5mM

Rosiglitazona 3μM

Tabla 3.6 Composición del medio de inducción.

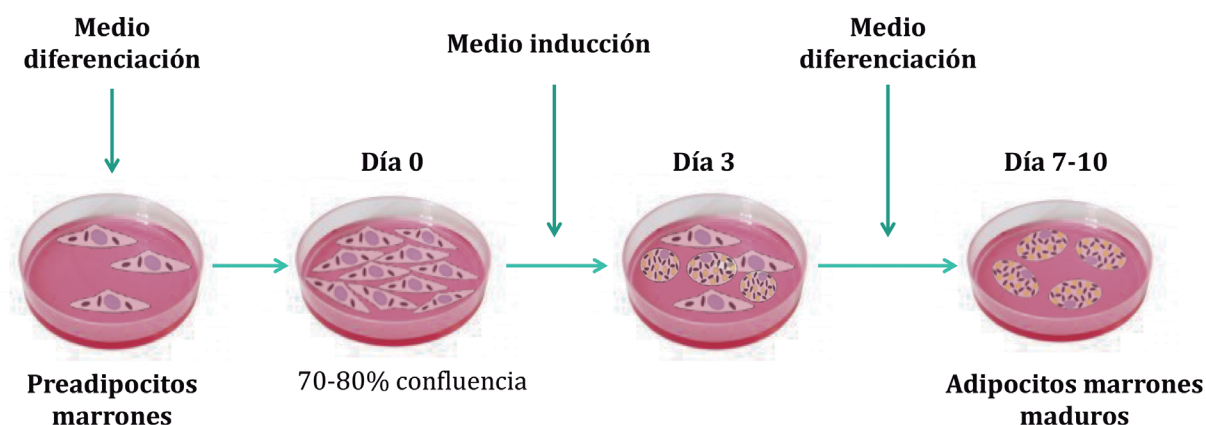


Figura 3.3. Protocolo de diferenciación de preadipocitos marrones.

3.2.4 Medida de la capacidad respiratoria celular mediante ensayos Seahorse®.

Para medir la capacidad respiratoria de las células, se utilizó el sistema Seahorse®. Este sistema permite medir la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en intervalos de aproximadamente 5-8 min. OCR es un indicador de la respiración mitocondrial mientras que ECAR es un reflejo de la glicolisis. La cantidad de oxígeno disuelto y los protones liberados en la microcámara transitoria son medidos mediante unos sensores que se encuentran unas 200 micras por encima de la monocapa de células sembrada. Estos sensores están formados por fluoróforos que van a reaccionar con el oxígeno o con los protones producidos por las células. Estos fluoróforos a su vez serán excitados con una luz y en función de su reacción con el oxígeno o los protones emitirán en una longitud de onda u otra. Este sistema a su vez dispone de cuatro puertos por cada uno de los pocillos, en los cuales se inyectaron distintos compuestos: Oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, bloquea el canal de protones de la subunidad F_0), FCCP (agente desacoplante, desacopla la cadena de transporte de electrones de la sín-

tesis de ATP), Antimicina A (se une a la Citocromo C reductasa y bloquea el gradiente de protones). El uso de estos compuestos nos va a permitir calcular distintos parámetros (Figura 3.4): Respiración basal (OCR antes de la aplicación de los compuestos), consumo de oxígeno destinado a la síntesis de ATP y fuga de protones (gracias a la aplicación de la Oligomicina), máxima capacidad respiratoria (viene dada por la aplicación de FCCP) y la respiración no mitocondrial (viene dada por la Antimicina A).

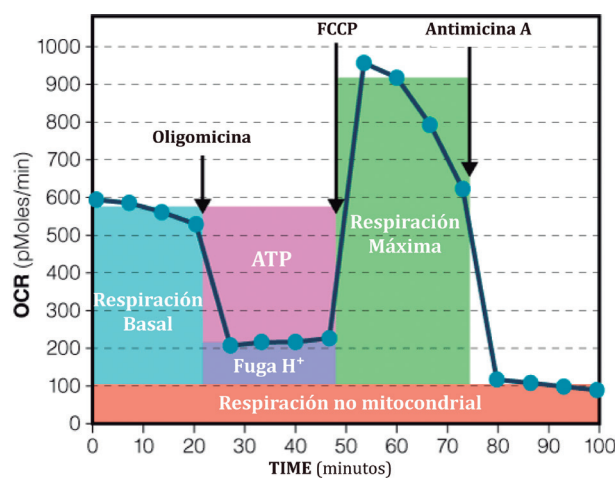


Figura 3.4. Ejemplo de los parámetros que pueden ser analizados mediante la adición de Oligomicina, FCCP y Antimicina A.

Para la realización del ensayo (Figura 3.5) el día previo al mismo, se sembraron 5000 preadipocitos marrones/pocillo en una placa de 96 pocillos que viene con el kit. En este punto siempre se dejaron vacíos, la primera y la última columna de la placa, para ser usados como *background*. También se procedió a hidratar el cartucho de Seahorse con 200 μ l/pocillo de XF Calibrant, se volvió a poner la parte superior del cartucho y se dejó en el incubador a 37 °C sin CO₂ durante toda la noche. Por otra parte, se preparó el medio de ensayo, para ello se añadió Glucosa 3mM al medio Seahorse que contiene Glutamax, se ajustó el pH a 7,4 y se filtró. El día del ensayo, se empezó realizando un cambio del medio normal de cultivo por el medio preparado el día anterior. La placa con las células se metió en un incubador a 37 °C sin CO₂ entre 45 min a 1h, para evitar cambios de pH en el medio. Durante este tiempo se prepararon los distintos estímulos: Oligomicina 3 μ M y

Antimicina A 4 μ M se prepararon en medio de ensayo mientras que el FCCP 2 μ M se preparó en piruvato sódico y se cargaron 25 μ l de cada compuesto en cada uno de los puertos, cargando en el cuarto puerto solamente medio de ensayo. Por último, se metió el cartucho cargado en el aparato de Seahorse® y se calibró durante 15 min. Trascurrido este tiempo se introdujo la placa con las células y se inició el protocolo predeterminado. Los resultados fueron generados con el *software* del propio aparato.

3.2.5 Medida del potencial de membrana mitocondrial.

Para la valoración del potencial de membrana mitocondrial, las células se sembraron en placas de cultivo con el fondo de cristal para permitir una correcta visualización en el microscopio confocal. Tras ser diferencia-

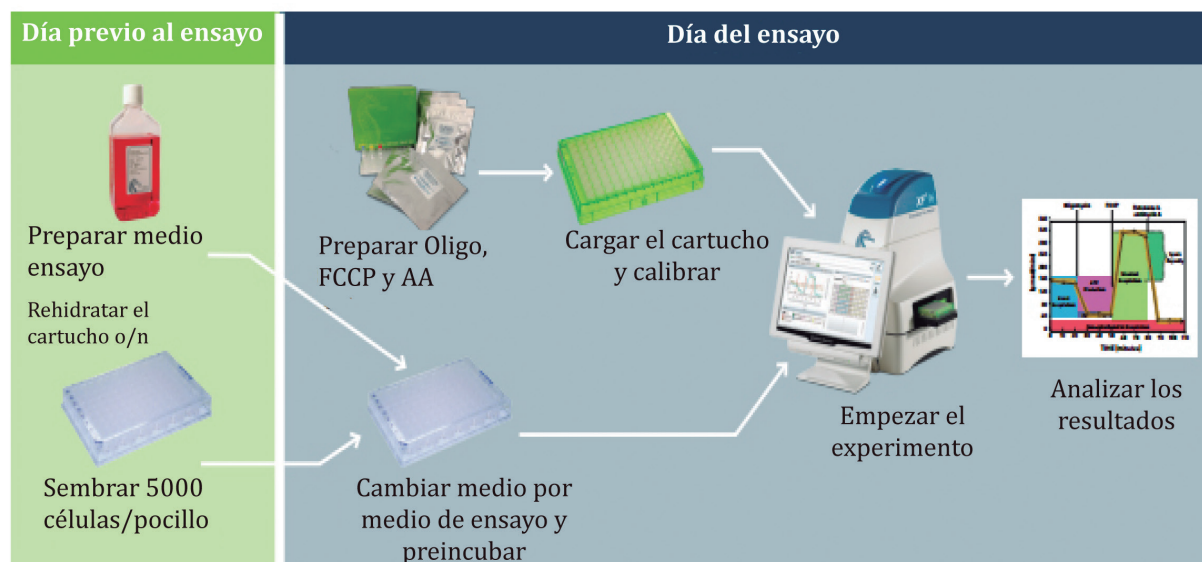


Figura 3.5. Esquema donde se representan los principales pasos a seguir para llevar a cabo un experimento de Seahorse®.

das (ver sección 3.2.3) durante 7 días, las células fueron lavadas con medio completo, se incubaron con la solución de tinción (15nM TMRE y 200nM MTG) durante 1 hora dentro del incubador. Tras este tiempo se retiró la solución, se lavó con medio completo y se añadió nuevamente 15nM TMRE. Para la preparación de la solución de tinción se diluyeron 5µl TMRE 15µM y 1µl MTG 1mM en 5ml de medio dentro de la campana de cultivos celulares y con la luz apagada debido a la fotosensibilidad de ambos compuestos. TMRE (Tetrametilrodamina etil-éster) es un colorante fluorescente rojo-naranja que se va a unir a las mitocondrias metabólicamente activas, debido a su carga negativa. Cuando las mitocondrias están inactivas o despolarizadas, este colorante no puede ser retenido dentro de las mitocondrias. Por otra parte, MTG (*MitoTracker Green*) es un colorante fluorescente verde que se une covalentemente a las mitocondrias independientemente de su potencial de membrana. De esta manera, al combinar ambos colorantes cuando las mitocondrias están hiperpolarizadas predominará el TMRE observándose las mitocondrias de un color naranja mientras que cuando están despolarizadas, TMRE va a salir de las mitocondrias y permanecerá únicamente la fluorescencia verde del MTG.

Para la cuantificación del potencial de membrana, se captaron diversas imágenes con el microscopio confocal Zeiss LSM880 (Oberkochen, Alemania). Durante la captación de las imágenes, las células fueron mantenidas a 37 °C y en presencia de 5 % CO₂. En primer lugar, se tomaron imágenes de las células en condiciones basales y tras guardar la posición exacta de dichas células, se añadió NA 10µM al medio de cultivo y se dejó actuar durante 45 min. Transcurrido este tiempo, se volvieron a capturar imágenes de las mismas células para comprobar así los efectos de dicho compuesto en la despolarización de las membranas.

3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

3.3.1 Aislamiento de ARN.

Se siguió el método de Chomczynski y Sacchi el cual consiste en la extracción de ARN con una mezcla de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo (Chomczynski P y Sacchi N, 1987). Las células se lavaron dos veces con PBS frío, y en una campana extractora de gases, y sobre hielo, se añadió 1ml Trizol® (Life Technologies) por placa de 10 cm de diámetro, con el fin de conseguir la lisis celular y solubilizar el ARN. Las muestras se homogenizaron y se trasladaron a tubos eppendorf, a los que se añadieron 500µL de cloroformo. Se agitaron las muestras con la ayuda de un vortex y se dejaron reposar 15 min en hielo. Tras este paso se centrifugaron las muestras (15 min, 15,000 × g, 4 °C). Tras la centrifugación, se obtienen dos fases, la inferior, orgánica, contiene las proteínas y el ADN y la superior, acuosa, que contiene el ARN el cual se trasladó a un nuevo tubo eppendorf. El volumen obtenido con el ARN solubilizado se mezcló con un volumen igual de isopropanol, se agitó por inversión y se mantuvo a -20 °C durante toda la noche para promover la precipitación de los ácidos nucleicos. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras (15 min a 15,000 × g y a 4 °C). El sobrenadante se eliminó por inversión y el precipitado se lavó con 1mL de etanol frío al 70% (v/v). Se volvió a centrifugar y el precipitado de ARN se resuspendió en 20 µL de ddH₂O-dietilpirocarbonato 0.1 % (v/v).

En el caso de la extracción de RNA de tejidos, en el caso del BAT se dedicó aproximadamente la mitad del tejido para la extracción de RNA, mientras que en el resto de tejido nunca se utilizaron más de 200 mg. Los tejidos fueron homogenizados en 1mL de Trizol® con *Ultra-Turrax T10 basic* (IKA, Stanfen, Alemania) a baja velocidad y durante, aproximadamente, 20 s en hielo. A continua-

ción, se siguió el mismo protocolo que con las células.

Durante todo el protocolo de aislamiento de ARN, se utilizaron puntas con filtro y se esterilizaron las superficies de trabajo con etanol 70 % (v/v) para evitar contaminaciones con enzimas que degradan el ARN (ARNasas).

3.3.2 RT-PCR.

3.3.2.1 Valoración de ácidos nucleicos.

El contenido de ácidos nucleicos se valoró mediante una lectura espectrofotométrica doble a 260 y 280 nm en una cubeta de cuarzo. A 260 nm los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción, mientras que a 280 nm presentan su máximo los aminoácidos aromáticos de proteínas. El ratio A260/A280 da una idea del grado de contaminación de las muestras con proteínas que, en condiciones óptimas, debe situarse entre 1.8 y 2. Para valorar el contenido de los ácidos nucleicos, hay que tener en cuenta que cada unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde con 20 µg/mL de oligonucleótidos, 40 µg/mL para ARN de cadena sencilla y a 50 µg/mL para ADN.

3.3.2.2 Síntesis de ADNc por retrotranscripción.

Para eliminar posibles contaminaciones con ADN, se incubaron 2-3 µg de ARN con 10 U de ADNasa I (Roche) en un tampón de incubación (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7.9) y 20 U de inhibi-

dor de ARNasas, RNasin (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.). La solución se puso en un termociclador con el siguiente ciclo: 37 °C 30 min, 95 °C 5 min y 4 °C ∞.

Para la síntesis del ADNc, la solución resultante de la reacción anterior fue sometida a transcripción inversa con ayuda del High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Se utilizaron primers aleatorios, retrotranscriptasa (50 U/µL) e inhibidor de ARNasa (1 U/µL) según las instrucciones del fabricante. La solución se puso en el termociclador con el siguiente ciclo: 25 °C 10 min, 37 °C 2 h, 85 °C 5 min y 4 °C ∞.

3.3.3 PCR y electroforesis en geles de agarosa.

La PCR fue realizada a partir de ADN extraído de cola de ratón o bien de ADNc. Se usaron reactivos de Biotools (Madrid) salvo excepciones indicadas. Para la reacción se utilizó un 1 µL de ADN en un volumen final de 25 µL compuesto de tampón de reacción [Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, pH 9.0], *primers* 0.2 µM (cada uno), dNTPs 0.2 mM (cada uno) y 1 U de ADN polimerasa. Las PCR se desarrollaron en un termociclador Veriti 96-well (Life Technologies). Para chequear la delección de los receptores en las líneas celulares y en el propio BAT de los modelos animales, se utilizó ADNc para realizar una PCR utilizando los siguientes *primers* y condiciones (Tabla 3.7).

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (Tm y ciclos)
<i>Igf1r</i> (exón 3)	S: 5'-CCGCTGCTGGACCACAAATC-3'	IGF1R 398pb	62°C, 40 ciclos
	AS: 5'-CTTCATCGCCGCAGACTTTG-3'	KO 85pb	
<i>Ir</i> (exón 4)	S: 5'-CTGTTCTGGAACCTGATGAC-3'	IR 512pb	58°C, 35ciclos
	AS: 5'-ATACCAGAGCATAGGAG-3'	KO 363pb	

Tabla 3.7 *Primers* utilizados para chequear la delección de los receptores en células y en BAT.

En la etapa de hibridación, la temperatura utilizada fue la temperatura de *melting* (T_m) teórica de los *primers* (ajustada por la concentración de sales y calculada con Primer-BLAST) restándole 5 °C. En los casos en los que fue posible, los ° fueron diseñados de forma que uno de ellos hibridase con uniones exón-exón (específicos de ARNm maduros). El producto de la PCR se completó con un tampón de carga, concentración final [Tris-HCl, 1.7 mM, azul de bromofenol 0.005 % (p/v), xileno cianol 0.005 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, pH 7.6] y fue resuelto mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1-3% (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) al que se le añadió el un agente intercalante del ADN, GelRed (Biotium, Hayward, EE.UU.) tras la disolución de la agarosa. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE. Como marcadores para electroforesis de ADN se utilizó el marcador Phi-X174/*Hae*III

(Promega). El resultado fue visualizado mediante un transiluminador UV, y las imágenes captadas con una cámara CCD (*charged coupled device*), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.).

3.3.4 PCR cuantitativa.

El contenido de ADNc obtenido a partir del ARN del BAT y los tejidos adiposos fue evaluado en un StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mediante la utilización de sondas Taqman® (Tabla 3.8) y Taqman® Fast Advanced Master Mix (ThermoFisher Scientific). La abundancia relativa de los ARNm fue calculada tomando el ARNm de GAPDH como control endógeno. Los resultados fueron calculados utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak KJ y Schmittgen TD, 2001).

Sonda	Referencia	Sonda	Referencia
Igf1	Mm00439560	AdrB3	Mm02601819
Lep	Mm00434759	Tfam	Mm00447485
Adipoq	Mm01343606	Fgf21	Mm00840165
Slc2a4	Mm01245502	Ppargc1	Mm00447101
Dio	Mm00515664	Tnf	Mm99999068
Prdm16	Mm00712556	Serpine	Mm00435860
Ucp1	Mm00494069	Usp15	Mm00452856
Gapdh	Mm03302249		

Tabla 3.8 Listado de sondas Taqman® utilizadas en los ensayos de PCR cuantitativa.

3.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.

3.4.1 Extractos proteicos.

3.4.1.1 Obtención de extractos proteicos.

En el caso de los tejidos (excepto BAT y tejidos adiposos), estos fueron cortados, pesados y homogenizados en tampón de lisis (1ml/mg tejido): Nonidet-P40 1% (v/v), Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, NaCl 150 mM, NaF 20 mM, pH 7.5 y añadidos extemporáneamente PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/mL y leupeptina 2 µg/mL y ortovanadato sódico 100µM. La homogenización del tejido se llevó a cabo con *Ultra-Turrax T10 basic* (IKA, Stanfen, Alemania) a baja velocidad y durante, aproximadamente, 20 s en hielo. Los extractos fueron centrifugados (15 min, 15,000 × *g*, 4 °C) y el sobrenadante se traspasó a nuevos tubos eppendorf.

En el caso del BAT, tejidos adiposos y células se utilizó tampón RIPA (tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación, Thermo Scientific) al que se le añadieron los inhibidores de proteasas. Para la obtención del extracto proteico, las células fueron lavadas 2 veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con 150 µL de tampón de lisis según el formato y densidad celular. El lisado se trasladó a tubos eppendorf y tras 5-10 min en hielo y un ligero agitado fueron centrifugados (15 min, 15,000 × *g*, 4 °C). Se recogió el sobrenadante con el lisado proteico, y se descartaron los restos celulares del *pellet*.

Los sobrenadantes resultantes fueron almacenados a -80 °C hasta su utilización.

3.4.1.2 Valoración de proteínas.

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (Bradford MM, 1976). Este ensayo se basa en la observación del cambio

de absorbancia (de 465 a 595 nm) que se produce cuando se añaden proteínas a una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por aminoácidos básicos (principalmente arginina) estabilizan la forma aniónica del reactivo indicador, causando un cambio de color visible. Como control, se prepara una curva de calibrado de 0-10 µg/mL a partir de una solución estándar de BSA de 2 mg/mL (Bio-Rad). Para el ensayo se cuantifica la absorbancia a 595 nm de una mezcla de 2 µL de la muestra a analizar en 1 mL de la solución de Bradford (Bio-Rad) diluida en ddH₂O (1:5).

3.4.2 Western blot.

3.4.2.1 Preparación de muestras para electroforesis.

Todas las muestras se prepararon a una concentración de 1 µg/µL de proteína total. El volumen total de muestra estuvo formado por: el volumen de proteína total necesario para alcanzar la concentración deseada, el volumen de tampón de Laemmli ([Laemmli UK, 1970](#)) 4X necesario para que quedara a 1X en función del volumen final [Tris-Hcl 100 mM, glicerol 5 % (v/v), SDS 2% (p/v), 2-mercaptoetanol 1 % (v/v), azul de bromofenol 0,004 % (p/v), pH 6.8] y por último el tampón de lisis necesario para ajustar el volumen final. Una vez preparadas, las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min. Se cargaron entre 30-40 µg de muestra por pocillo en geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). En cada gel se cargó también un marcador del peso molecular Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad, California, EE.UU.).

3.4.2.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE.

El fraccionamiento del componente proteico de los extractos celulares, se realizó por electroforesis en geles discontinuos de SDS-PA-

GE, según el método descrito por Laemmli (Laemmli UK, 1970), empleando un equipo de electroforesis Miniprotean II o TetraSystem (Bio-Rad).

Para llevar a cabo la electroforesis, previamente se prepararon geles con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 4 % para el gel superior (concentrante) y entre 6-15 % para el gel inferior (separador). El gel concentrante, contiene los pocillos donde se cargan las muestras, su función es concentrar y alinear las muestras. El gel separador, tiene como función separar las proteínas en función del peso molecular. La concentración de poliacrilamida del gel separador varió en función del peso molecular de las proteínas a analizar. La composición de los geles fue la siguiente: solución al 30 % de acrilamida y bis-acrilamida en proporción 29:1 (Bio-Rad); SDS, que confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, Tris-HCl pH 8.8 en el gel separador y pH 6.8 en el concentrante; persulfato amónico y TEMED (Panreac, Barcelona, España), que catalizan la polimerización del gel. Las proporciones de los diferentes componentes variaron según el tipo y el porcentaje del gel.

Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó el siguiente tampón: Tris-base 25 mM, glicina 190 mM y SDS 0.1 % (p/v), pH 8.3, con una fuente Powerpac HC (Bio-Rad), a un voltaje constante de 90 V para el gel concentrante y de 125 V para el gel separador durante 1.5-2 horas.

3.4.2.3 Transferencia a membranas de PVDF.

Una vez finalizada la separación de proteínas, éstas se transfirieron desde los geles SDS-PAGE a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) Immobilon-P 0.45 μ m (Merck Millipore, Billerica, EE.UU.). Antes de comenzar la transferencia, las membranas de PVDF,

altamente hidrofóbicas, se activaron por un breve paso por metanol y se mantuvieron en tampón de transferencia.

A continuación, se construyó un sándwich formado por: una almohadilla, 2 papeles Whatman, el gel, la membrana de PVDF, otros dos papeles Whatman y otra almohadilla. El sistema se introdujo en una carcasa, de tal forma que las proteínas migraran hacia el polo positivo. El tampón de transferencia usado fue 25 mM Tris, 192 mM glicocola, metanol 20 % (v/v). El proceso de transferencia fue llevado a cabo con el equipo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), con un voltaje constante de 110 V y una resistencia inicial de 350 mA, durante 1 h y 10 min en hielo.

3.4.2.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos.

Cuando terminó la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 h, a T^a ambiente y con agitación suave, en TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) más Tween-20 0.05 % (v/v) (TTBS); suplementado con 5 % (p/v) de leche en polvo desnatada o BSA al 3 % (p/v) para que se bloquearan los sitios de unión inespecíficos a proteínas. Generalmente, cuando los anticuerpos primarios dieron mucho ruido de fondo al revelar o cuando se utilizaron anticuerpos primarios fosfo-específicos, las membranas se bloquearon con BSA, ya que la leche en polvo contiene grandes cantidades de fosfo-proteínas como la caseína.

Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en TTBS a 4 °C y con agitación suave. Algunos anticuerpos fueron incubados en solución de bloqueo para reducir el fondo que mostraban durante el revelado. La lista con todos los anticuerpos utilizados y sus diluciones se encuentra en la *sección 3.8.3*.

Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces con TTBS durante un total de 30 min en agitación fuerte. Tras los lavados, se incubó con el anticuerpo secundario frente a la fracción constante de la especie correspondiente en la que se hubiese generado el anticuerpo primario, preparado en una solución de TTBS durante 1 h, a T^a ambiente y con agitación suave. Finalmente, se volvió a lavar con TTBS otras 3 veces durante, aproximadamente, 30 min y con agitación fuerte.

3.4.2.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia.

Para detectar los anticuerpos secundarios, los cuales están conjugados a peroxidasa de rábano (HRP), las membranas se incubaron con reactivos de quimioluminiscencia. La detección se basa en la reacción catalizada por la HRP, es decir, en la oxidación del luminol en presencia de H₂O₂ y un catalizador a 3-aminofalato, el cual decae a su estado fundamental emitiendo luz visible (432 nm). Para ello se usó Immun-Star™ WesternC™ (Bio-Rad), según las instrucciones del fabricante. Los resultados se observaron mediante la utilización del sistema de detección de quimioluminiscencia por cámara CCD, ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), el cual permite la digitalización directa de los resultados.

3.4.2.6 Borrado de membranas de PVDF.

Siempre que se revelaron anticuerpos fosfo-específicos, las membranas fueron normalizadas tanto con su β-actina o α-tubulina como con la proteína total correspondiente. El proceso de borrado consiste, en la eliminación del anticuerpo primario y secundario unidos a la membrana, para dejar libres los epítomos para una nueva hibridación, en este caso con la proteína total. Para ello, las membranas de PVDF se incubaron con un tampón de borrado (Tris-HCl 62.5 mM, SDS 0.5 % y 2-mercaptoetanol 100 mM, pH 6.8) durante

15 min a 55 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron varias veces en TTBS antes de ser incubadas con el nuevo anticuerpo.

3.5 HISTOLOGÍA Y MICROSCOPÍA.

3.5.1 Preparación de los tejidos para las tinciones.

3.5.1.1 Fijación, inclusión en parafina y obtención de cortes.

De los tejidos obtenidos en el sacrificio de los animales, se reservó una pequeña porción para histología. Estos fragmentos de tejido fueron fijados durante toda la noche en una solución de formaldehído al 4%. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 1h cada uno con etanol al 70 %, para precipitar las sales formadas por el tampón en el que se encuentra el formaldehído. Tras este paso, los tejidos fueron incluidos en bloques de parafina. Para ello, los tejidos fueron deshidratados mediante su paso por una batería de alcoholes de gradación creciente hasta llegar a alcohol 100°. Posteriormente, el tejido se transfirió a xileno, miscible tanto con el alcohol de 100° como con la parafina. Por último, los tejidos se pasaron a recipientes con parafina líquida (estufa a 50°C). Se dieron dos pasos por parafina líquida para favorecer la eliminación de los posibles restos de xileno. Tras el embebimiento completo de la muestra, la parafina líquida se vertió en un molde en el que se introdujo la muestra y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los bloques de parafina fueron conservados a 4 °C hasta su utilización.

Los bloques de parafina de los distintos tejidos, previamente enfriados, fueron procesados con un microtomo Leica RM2125RT, obteniéndose cortes de entre 5-7 μm que fueron depositados en la superficie de un baño de agua a 55 °C para su completa extensión y, seguidamente, colocados sobre los portaobjetos. Se obtuvieron alrededor de 10

cortes por cada región del bloque. En el caso del BAT y los tejidos adiposos, para obtener cortes que representaran la totalidad del tejido, se obtuvieron cortes de 5 regiones por tejido, descartando alrededor de 20 cortes entre cada región.

3.5.1.2 Desparafinización e hidratación de cortes.

Para eliminar el medio de inclusión, los portaobjetos con los cortes se introdujeron en xilol (2 incubaciones de 10 min), a continuación, en etanol absoluto (2 incubaciones de 2 min) y, por último, en una serie de etanoles de concentración decreciente 90, 80, 70 % (v/v), 1 min por cada solución. Seguidamente, los portaobjetos fueron lavados varias veces en agua para poder ser utilizados en las tinciones correspondientes.

3.5.2 Tinción con hematoxilina y eosina.

Tras el proceso de desparafinización mencionado anteriormente, los cortes de BAT, tejidos adiposos e hígado fueron teñidos con hematoxilina y eosina para observar la morfología de las células que conforman cada uno de los tejidos. Para ello, los portas con los tejidos se pasaron por una cubeta con hematoxilina durante 15 min, para teñir las estructuras ácidas (núcleos). A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 min en H₂O para eliminar el exceso de colorante y posteriormente, los portas se pasaron a una cubeta con eosina durante 10 segundos, para teñir las estructuras básicas (citoplasma y matriz extracelular). Tras realizar los lavados en agua como hicimos previamente con la hematoxilina, los portas fueron deshidratados mediante la utilización de una batería de alcoholes de gradación creciente hasta llegar al xileno. Finalmente, se montaron las preparaciones mediante el uso de DPX como medio de montaje.

3.5.3 Inmunofluorescencia de células en cultivo.

Para los experimentos de inmunofluorescencia, se depositaron cristales circulares de 1 cm de diámetro en el fondo de los pocillos, sobre los que posteriormente se sembraron las células. Tras la estimulación de las mismas, las placas fueron lavadas dos veces con PBS frío para parar la estimulación y para eliminar los restos de suero. A continuación, se añadió Paraformaldehído al 4% (p/v) para fijar las células durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, se lavaron los pocillos 3 veces con PBT (PBS1X con 0,1% de Tween) durante 5 min a temperatura ambiente. Para permeabilizar las células y poder realizar el marcaje de antígenos intracelulares, se incubaron las células con 0,1% Tritón X-100 en PBT durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras este tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBT y se incubaron con NH₄Cl 50mM durante 15 min a temperatura ambiente con el fin de disminuir la posible autofluorescencia de las células. Tras otros tres lavados con PBT, las células se incubaron con la solución de bloqueo (BSA 1% p/v, Tritón X-100 0,2% v/v en PBT) durante 30 min a temperatura ambiente, para bloquear los sitios de unión inespecíficos. A continuación, se incubaron las células con los anticuerpos primarios (pueden ser usados de manera individual o de dos en dos para realizar marcajes dobles). El anticuerpo primario se preparó en la solución de bloqueo usando una dilución 1:75 y se dejó incubar en una cámara húmeda toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBT y se las células se incubaron con el anticuerpo secundario, preparado en solución de bloqueo, durante 45 min a temperatura ambiente. Cuando se realizó un marcaje con dos anticuerpos primarios, este paso se tuvo que hacer dos veces, una vez por cada anticuerpo secundario usado. Tras los últimos lavados con PBT, las preparacio-

nes se montaron sobre un portaobjetos con un líquido de montaje SlowFade Gold (Life Technologies) que contiene DAPI para la visualización de núcleos.

La visualización de los resultados se llevó a cabo en el CAI de Microscopia de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid. Para la toma de imágenes se utilizó un microscopio de fluorescencia semi-automático Biozero BZ-8000 (Keyence, Osaka, Japón).

Todas las imágenes fueron obtenidas en formato de 1024×1024 píxeles, a una velocidad de $0,5\text{--}5 \mu\text{s/píxel}$ (dependiendo del experimento). Para el análisis de la colocalización, los detalles fueron visualizados utilizando un objetivo 63x Zeiss Plan-Apochromat oil (apertura numérica 1.4).

3.5.4 Inmunohistoquímica de BAT y tejidos adiposos.

Cortes de BAT, iWAT y eWAT, fueron desparafinados y rehidratados (*ver sección 3.5.1.2*). Tras este paso, se procedió a desenmascarar los antígenos, ya que la extensa fijación con aldehídos produce gran cantidad de puentes metileno a lo largo de la estructura de la proteína, lo cual puede ocultar los epítomos reconocidos por los anticuerpos. Para ello se hirvieron los cortes en una solución de citrato sódico 10mM pH 6 durante 20 minutos. Posteriormente, los cortes se lavaron tres veces con ddH_2O y se incubaron con una solución de H_2O_2 3% (v/v) para bloquear a las peroxidases endógenas. Tras dos lavados con ddH_2O , fueron incubados en solución de bloqueo (10% suero de cabra) durante 1h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Seguidamente se añadió el anticuerpo primario UCP1 (Abcam, ab10983) a $2 \mu\text{g/ml}$ en PBT con 1% BSA, durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente, se lavaron 3 veces en PBT y se incubaron con el anticuerpo

secundario conjugado a la peroxidasa burro anti-conejo IgG a una dilución 1:500 (GE healthcare). Después de un par de lavados en PBT, se procedió al revelado mediante el uso de 3,3'-diaminobenzidina y un cromógeno (Dako), siguiendo las instrucciones del fabricante. La 3,3'-diaminobenzidina forma un precipitado marrón local al oxidarse en presencia de H_2O_2 y peroxidasa. La reacción se paró a los 2-5 min bajo el microscopio, introduciendo las preparaciones en ddH_2O . Tras parar la reacción las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina para visualizar los núcleos.

3.5.5 Microscopía electrónica.

Para el análisis de las muestras de BAT por microscopía electrónica, tras el sacrificio de los animales y la extracción del BAT, se depositaron fragmentos de 1mm^2 (3 WT y 3 DKO), en una placa Petri con una solución de: paraformaldehído al 4 % (Electron Microscopy Tech), 2,5% glutaraldehído (Sigma) en solución de fosfato sódico 0,1M pH7.3 durante 4 h a 4°C . Tras retirar el fijador, se realizaron 4 lavados de 5min con tampón fosfato y se mantuvieron los tejidos en dicho tampón a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se aspiró el tampón y se añadió OsO_4 al 1 % en ddH_2O durante 1h a temperatura ambiente. Se aspiró el osmio (y los residuos fueron neutralizados con leche en polvo), se realizaron 4 lavados de 5min en ddH_2O y se procedió a la deshidratación de las muestras mediante una batería de acetonas creciente durante 15min por cada paso. El siguiente paso, fue la infiltración de las muestras en resina Epon-812 (TAAB, Aldermaston, Reino Unido) pasándose por mezclas etanol: resina (3:1, 1h; 1:1, 1h; 1:3, 2h; resina pura). La resina pura se cambia a las 24 horas para finalmente formar los bloques que se dejarán polimerizar en la estufa a 70°C durante 48-72 h.

Los bloques generados se llevaron al CAI de Microscopia Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid. Allí se cortaron secciones de unas 60 nm con un ultramicrotomo Ultracut E (Leica), se tiñeron con citrato de plomo y se examinaron con el microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (JEOL, Tokio, Japón).

3.5.6 Tinción de lípidos celulares con Oil Red O.

Para la tinción de lípidos celulares, fragmentos de hígado, músculo y corazón fueron embebidos en Tissue-Tek® y congelados en nitrógeno líquido tras su extracción. Los bloques generados, se cortaron en un criostato Leica CM1510S en secciones de unas 7 µm. Las secciones se depositaron sobre portas y estos fueron almacenados a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Previamente a la tinción, se dejaron los portas unos 10min a temperatura ambiente. A continuación, los portas se sumergieron en una solución de Oil Red O (Mehlem A *et al.*, 2013) durante 10-15min a temperatura ambiente. Por último, tras varios lavados en ddH₂O, se realizó una contratinción con hematoxilina para marcar los núcleos y los cubreobjetos se montaron con un medio de montaje soluble en agua.

3.6 TEST METABÓLICOS.

3.6.1 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).*

La cuantificación de distintos parámetros metabólicos como insulina (#EZRMI-13K, Merck Millipore), IGF1 (RAB0229, Sigma-Aldrich), leptina (#EZML-82K, Merck Millipore), adiponectina (#EZMADP-60K, Merck Millipore), TNF-α (EZMTNFA, Merck Millipore), T3 (KA0925, Abnova, Taiwan, China), BMP7

(EMBP7, Thermo Scientific) se realizaron mediante ELISA. Para ello se utilizaron las muestras de plasma de animales alimentados y se realizaron duplicados en cada uno de los ensayos. La realización de cada uno de los ELISA fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones de cada uno de los fabricantes.

3.6.2 Metabolismo lipídico.

3.6.2.2 Ensayos colorimétricos para la medida de colesterol y triglicéridos plasmáticos.

En el caso de los triglicéridos y el colesterol plasmático las valoraciones se llevaron a cabo mediante ensayos colorimétricos. Para los triglicéridos, se utilizó 1 µl de plasma y el kit de triglicéridos de Spinreact (Girona, España) según las instrucciones del fabricante. La determinación de los triglicéridos con este kit se basa en la utilización de varias enzimas: lipoproteína lipasa (LPL), Glicerol quinasa (GK) y Glicerol-3-oxidasa (GPO). Así en primer lugar los TG son hidrolizados por la lipasa a Glicerol y ácidos grasos libres. A continuación, la GK fosforila al Glicerol dando Glicerol 3 fosfato (G3P) y en último lugar la GPO va a oxidar a el G3P a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno. Finalmente, el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol gracias a la acción de la peroxidasa (POD) dando una coloración roja que será proporcional a la cantidad de triglicéridos presentes en la muestra.

Para la valoración del colesterol, también se utilizó 1 µl de plasma y el kit de determinación de Colesterol-LQ de Spinreact. La determinación del colesterol se basa en la acción de la acción de la enzima colesterol esterasa (CHE) sobre los esteres de colesterol para dar colesterol y ácidos grasos. A continuación, el colesterol va a ser oxidado por la colesterol oxidasa (CHOD) para dar 4-Coles-

tenona y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno va a reaccionar con el fenol y la 4-aminofenazona debido a la acción de la POD para dar lugar a Quinonaimina coloreada en función de la cantidad de colesterol presente en la muestra.

3.6.2.2 Ensayos de lipólisis *ex vivo*.

A partir de las muestras de BAT previamente extraídas, se eliminaron todos los restos de WAT en la medida de lo posible y siempre que se dispuso de tejido suficiente se cortaron fragmentos de unos 15mg por duplicado. A continuación, se pusieron cada uno de los fragmentos en tampón de Krebs previamente calentado a 37 °C. Posteriormente se transfirieron las muestras a eppendorfs con 1ml de tampón de Krebs precalentado durante 2h para recolectar los TG liberados.

Los TG y el glicerol presente en la muestra fueron medidos utilizando el kit de determinación de triglicéridos en suero de Sigma (TR0100) según las instrucciones del fabricante. Tras calcular los mg/dl de TG y de glicerol, se procedió a convertir estos valores a mM. Finalmente, los resultados fueron expresados como (mM TG – mM Glicerol) /2h x g tejido.

3.7 OTRAS TÉCNICAS.

3.7.1 Cuantificación.

3.7.1.1 Cuantificación imágenes RMN.

Para analizar los resultados con Image J (Figura 3.6) en primer lugar, debemos abrir las imágenes correspondientes al volumen de grasa y al volumen corporal de cada animal. Una vez que tenemos ambos archivos

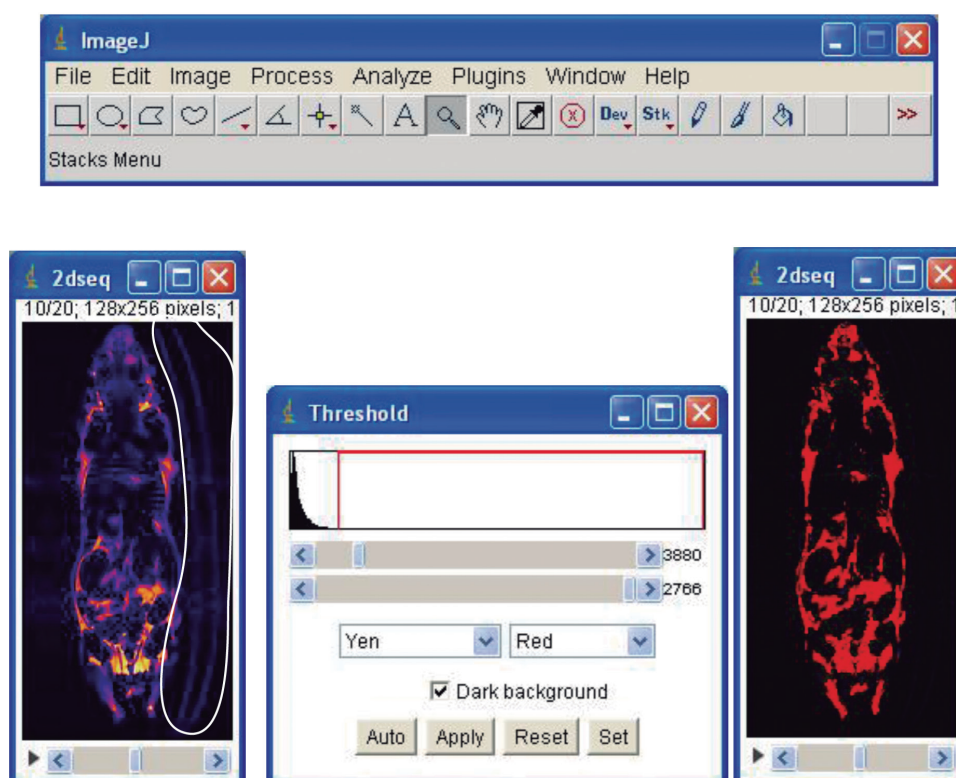


Figura 3.6. Representación de los pasos a seguir para el análisis de las imágenes de RMN. En la imagen de la izquierda se observa uno de los cortes de los archivos correspondientes al volumen de grasa. Rodeado por un círculo blanco podemos ver la presencia de la sonda que se utiliza para anestesiarse a los animales, la cual debe ser eliminada en todos los cortes antes de continuar con el análisis. En la parte derecha de la imagen podemos ver un ejemplo de cómo establecer el threshold que posteriormente nos dará el área en pixel de cada imagen. Este mismo proceso se deberá repetir con cada uno de los cortes de los archivos correspondientes al volumen corporal total del animal.

abiertos, debemos eliminar de las imágenes los posibles ruidos de fondo que puedan interferir en el posterior análisis (restos de la cola, presencia de la sonda de anestesia y las interferencias de la respiración). Una vez eliminadas en cada uno de los cortes longitudinales de los archivos correspondientes al volumen de grasa y al volumen corporal, se estableció un threshold con el cual debemos diferenciar entre los píxeles correspondientes a la grasa/volumen total de los píxeles que forman parte del fondo de la imagen. A partir de este punto, se calcula el área ocupada por dichos píxeles y se transformará a unidades de volumen al multiplicar dicho valor por el área ocupada por cada píxel $0.390625 \times 0.390625 \times 1 \text{ mm}^3$. Posteriormente los re-

sultados se pasaron a % y se representaron como % de volumen de grasa corporal/volumen total del animal.

3.7.1.3 Cuantificación *blots*.

Los *blots* fueron cuantificados usando la herramienta Analyze/Gels de ImageJ. Para ello se seleccionó con un rectángulo un área que incluyera todas las bandas del *blot*, se dibujó una línea base y se calculó el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa a cada punto (Figura 3.7) Los resultados fueron siempre normalizados con la señal del control invariable (β -actina, α -tubulina o GAPDH).

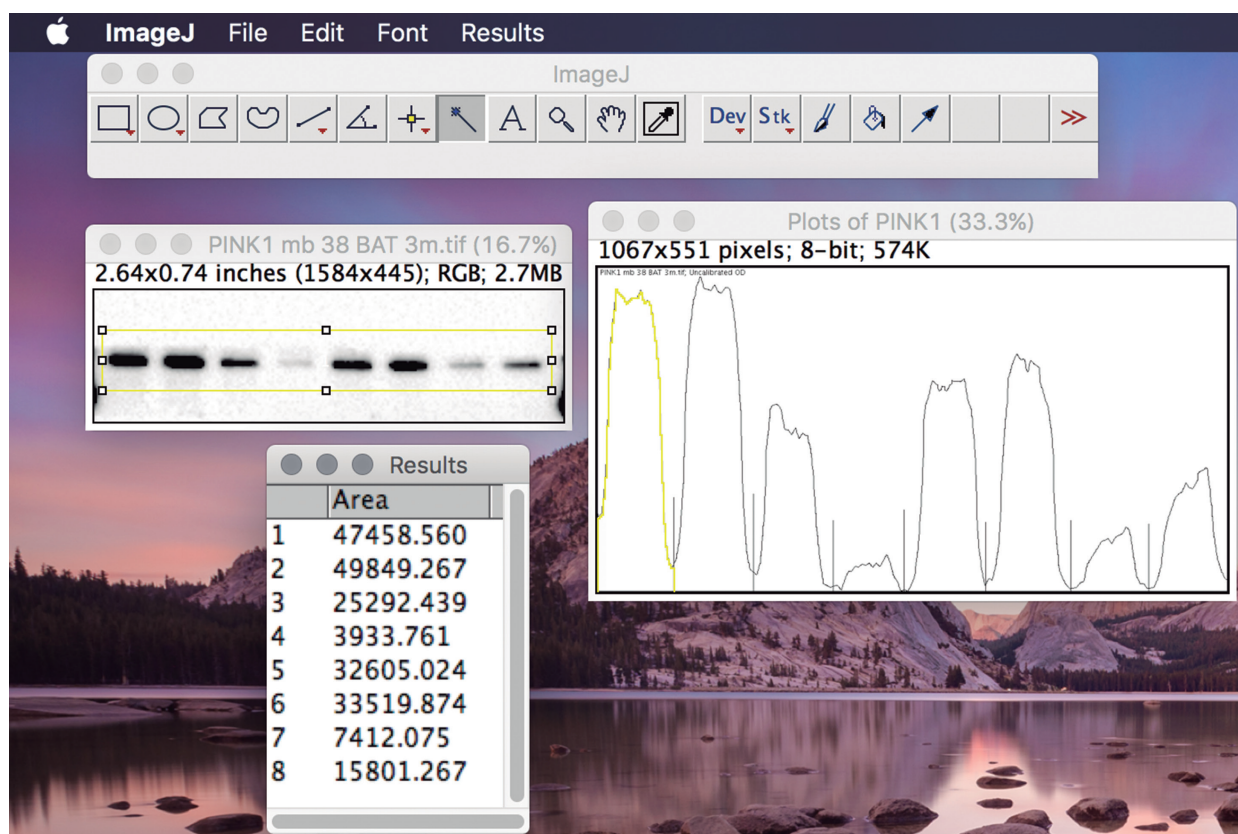


Figura 3.7 Ejemplo representativo de la cuantificación de imágenes de *western blot*.

3.7.1.4 Cuantificación inmunofluorescencia.

Para analizar el aclaramiento de la proteína HADHA por inmunofluorescencia se utilizó el *software* ImageJ (v1.48, NIH). Para ello se dibujó un círculo alrededor de cada célula y se midió la media de fluorescencia en comparación con algunas mediciones realizadas en el fondo de la imagen. A continuación, se midió la fluorescencia celular total corregida (TCCF) (McCloy RA *et al.*, 2014)

Para analizar la colocación de TOM20 con p62, se utilizó el plugin Coloc2 para la *software* Fiji y se determinó el coeficiente de Mander's (Manders E *et al.*, 1992).

3.7.1.5 Cuantificación Oil Red O.

Para la cuantificación, se tomaron imágenes en el microscopio invertido Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokio, Japón) acoplado a una cámara y a una lámpara de mercurio. Por cada animal se tomaron 6 imágenes procedentes de distintas secciones a un aumento 20x. Para la cuantificación, se utilizó el *software* ImageJ (v1.48, NIH) (Figura 3.8). Cada una de las imágenes se abrieron con Image J de tal manera que se separaron los tres canales de color que las componen: rojo, verde y azul. Se utilizó el canal verde para el establecimiento del *threshold* que marcara la tinción de lípidos. A continuación, se realizaron los mismos pasos, pero en este caso para seleccionar el área total de la sección de tejido

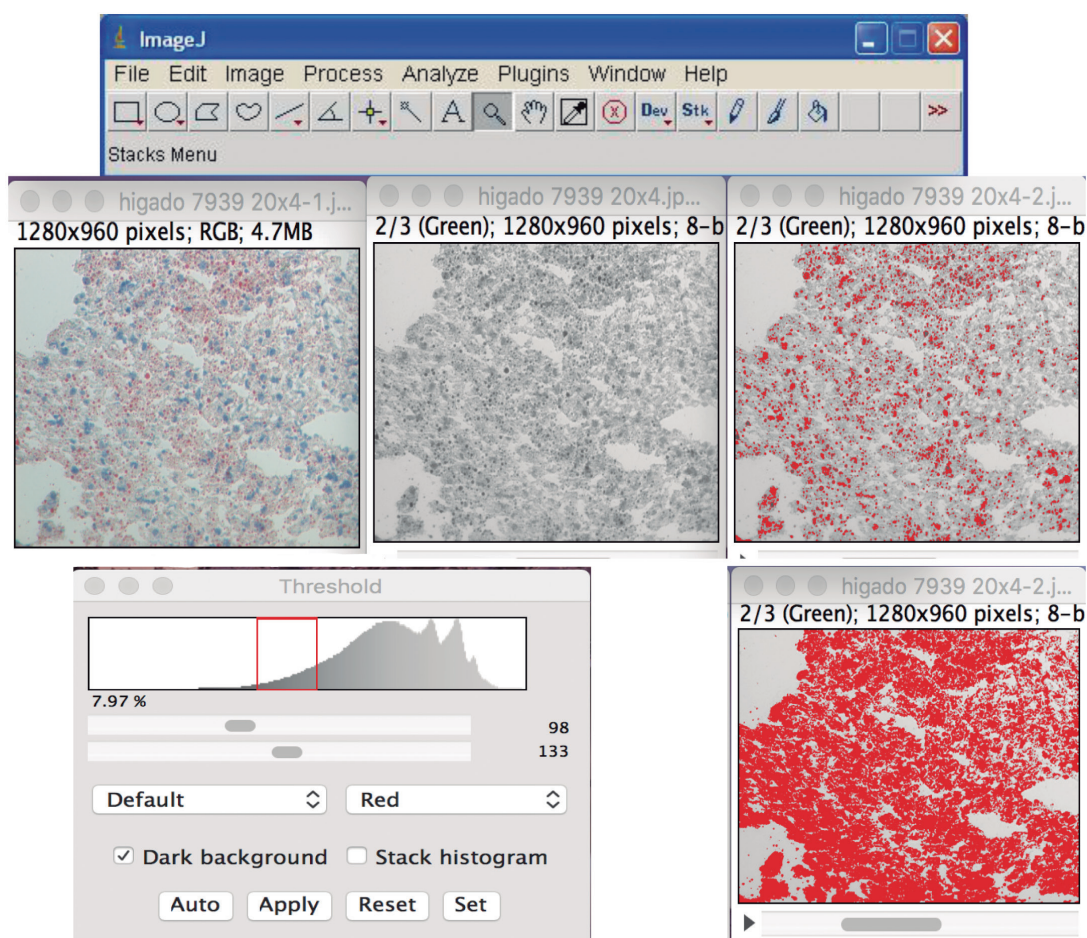


Figura 3.8 Representación de los pasos a seguir para la cuantificación del contenido lipídico mediante tinción Oil Red O.

analizada. Los resultados fueron representados como el cociente de tinción positiva/área del tejido.

3.7.1.6 Cuantificación del tamaño y número de adipocitos y mitocondrias.

Para cuantificar el tamaño y el número de los adipocitos, se utilizaron las imágenes procedentes de las tinciones con hematoxilina y eosina. Se tomaron 6-8 imágenes de cada tejido con el microscopio invertido a un aumento 20x y estas fueron cuantificadas utilizando el *software* Image J. Para ello se utilizó la herramienta de selección libre, para seleccionar el área de cada célula y cuantificar posteriormente su área. Se cuantificó el área de unos 200 adipocitos por ratón. En cuanto al número de adipocitos, se utilizó el *plugin* *Cell counter* y se cuantificaron todos los núcleos presentes en cada una de las imágenes.

En el caso de la cuantificación de las mitocondrias, se tomaron imágenes de 20 células por ratón a 4500x para cuantificar el número de mitocondrias y a 25000x para cuantificar el área de las mitocondrias. Las cuantificaciones tanto del número como del área de las mitocondrias se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

3.7.1.7 Cuantificación potencial de membrana mitocondrial.

A partir de las imágenes tomadas antes y después de la estimulación con NA. Se midió la intensidad de fluorescencia roja (TMRE) y verde (MTG) de las mitocondrias de cada célula individual antes y después de ser estimuladas utilizando el *software* ImageJ. Tras establecer el ratio TMRE/MTG, se aplicó la ecuación de Nernst la cual permite convertir los valores de intensidad de fluorescencia a valores absolutos en milivoltios (mV) (Wikstrom JD et al.,2007). De esta manera podemos calcular el $\Delta\Psi_m$ (mV) tras el tra-

tamiento con NA, compuesto que induce la despolarización de las membranas mitocondriales en condiciones normales.

3.7.2 Estadística.

Todos los valores que aparecen en esta tesis han sido representados como la media \pm SEM. En el caso de los experimentos *in vitro*, se realizaron tres experimentos independientes y en los experimentos con animales el número mínimo de animales usados fueron 3 por cada grupo. Los análisis estadísticos aplicados fueron *t* de Student (para la comparación de los valores medios de dos muestras independientes) y ANOVA de una o dos vías (cuando se necesitó realizar comparaciones múltiples) seguido del post-test Tukey o Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $P < 0.05$.

3.7.3 Técnicas bioinformáticas.

3.7.3.1 Trabajo con imágenes.

- **Adobe Photoshop CS6** (Adobe, San Jose, EE.UU.). Ajustes de imágenes.
- **Adobe Illustrator CS6**. Para la realización de esquemas.
- **ImageJ** (National Institutes of Health).

Software gratuito usado para análisis de imágenes (área y número de células y/o mitocondrias), densitometría de *blots*, cuantificación de la intensidad de fluorescencia, cuantificación contenido lipídico y cuantificación imágenes RMN.

- **Image Lab** (Biorad). *Software* gratuito usado para la obtención de las imágenes de *western blot* con ChemiDoc™ XRS.

3.7.3.2 Otros.

- **GraphPad** (<http://www.graphpad.com/quickcalcs>). Aplicación online usada para cálculos estadísticos.
- **Phenomaster** TSE Systems (Bad Homburg, Alemania). *Software* utilizado para analizar los resultados de las jaulas metabólicas.

3.8 MATERIALES.

3.8.1 Agentes farmacológicos.

CCCP (Carbonilcianuro m-clorofenilhidrazona) Sigma-Aldrich

Inhibidor químico de la fosforilación oxidativa, impide el funcionamiento de la ATP sintasa al funcionar como ionóforo en la membrana mitocondrial, produciendo el colapso del $\Delta\psi_m$. Es comúnmente usado como inductor de mitofagia.

Soluble: DMSO, 100 mM.

Concentración efectiva: 5-30 μ M

Cloroquina, difosfato (N'-(7-cloroquinolil-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina) Sigma-Aldrich.

Compuesto lisosomotropo que aumenta el pH lisosomal, llevando a la inhibición de la fusión autofagosoma-lisosoma. Compuesto relacionado estructuralmente con la quinina, alcaloide obtenido de corteza de *Cinchona sp.*

Soluble: agua, 50 mg/ml.

Concentración efectiva: 10-25 μ M

IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) Sigma-Aldrich.

Inhibidor no específico de las fosfodiesterasas de AMPc y GMPc. El aumento de los niveles de AMPc activan a la PKA disminuyendo la proliferación y aumentando la diferenciación ([Wang YL et al., 2016](#)).

Soluble: DMSO, 1M. Etanol 10mg/ml

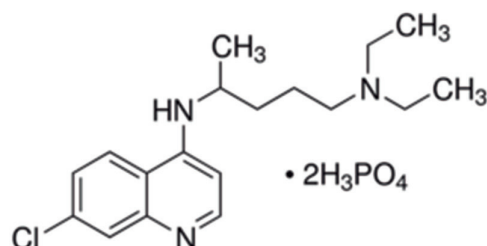
Dexametasona. Sigma-Aldrich.

Agonista del receptor de glucocorticoides.

En la diferenciación de los adipocitos marrones induce la expresión de UCP1, CIDEA, PGC1- α

([Barclay JL et al., 2015](#)).

Soluble: etanol absoluto, 20 μ g/ml.



Rosiglitazone. Sigma-Aldrich.

Potente agonista de PPAR γ . Actúa como anti-diabético, ya que aumenta la sensibilidad a la insulina al unirse a los receptores de PPAR γ de los adipocitos, haciéndolos más sensibles a su acción. Además, es capaz de inducir la expresión de UCP1 ([Morganstein DL et al., 2010](#)).

Soluble: DMSO, \geq 10mg/ml

T3 (3,3',5 triyodotironina). Sigma-Aldrich.

Hormona tiroidea, ejerce efectos en multitud De procesos biológicos: crecimiento y desarrollo,

Metabolismo, temperatura corporal y ritmo cardíaco. En el BAT, aumenta los niveles de ARNm de Ucp1 y aumenta los niveles de UCP1 inducidos por la estimulación adrenérgica ([Obregon MJ, 2008](#)).

Soluble: metanol, 5mg/ml

3.8.2 Listados de anticuerpos.

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución	Uso
IGF1Rβ (C-20)	Santa Cruz, sc-713	Rabbit	1:500	WB
IR β (C-19)	Santa Cruz, sc-711	Rabbit	1:1000	WB
PI3 Kinase p85α	Santa Cruz, sc-423	Rabbit	1:1000	WB
IRS1	Millipore #06-248	Rabbit	1:500	WB
IRS2	Millipore #06-506	Rabbit	1:500	WB
p-Akt (Ser473)	Cell Signaling, #9271	Rabbit	1:1000	WB
p-Akt (Thr308)	Cell Signaling, #2965	Rabbit	1:1000	WB
Akt	Cell Signaling, #9272	Rabbit	1:1000	WB
HSL	Cell Signaling, #4107	Rabbit	1:1000	WB
CPTI-M (H-120)	Santa Cruz, sc-20670	Rabbit	1:1000	WB
UCP1 (M-17)	Santa Cruz, sc-6529	Goat	1:500	WB
UCP1	Abcam, ab10983	Rabbit	1:1000	IHC, WB
UCP2 (C-20)	Santa Cruz, sc-6525	Goat	1:1000	WB
UCP3 (C-20)	Santa Cruz, sc-7756	Goat	1:1000	WB
BMP7(EPR5897)	Epitomics #5626-1	Rabbit	1:500	WB
ACVR1	Cell Signaling, #4398	Rabbit	1:500	WB
p-Smad 1/5/8	Cell Signaling, #9511	Rabbit	1:1000	WB
Citocromo C	Santa Cruz, sc-13560	Mouse	1:1000	WB

Tabla 3.9. Listado de anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Casa comercial	Origen	Dilución	Uso
HSP60	Enzo Life Sciences	Mouse	1:1000	WB
β2-AR (M-20)	Santa Cruz, sc-570	Rabbit	1:1000	WB
p-Drp1 (Ser616)	Cell Signalling, #3455	Rabbit	1:1000	WB
Bcl2	Cell Signalling, #2876	Rabbit	1:1000	WB
LC3 A/B	Cell Signalling, #4108	Rabbit	1:1000	WB
PGC1-α	Cell Signalling, #2178	Rabbit	1:1000	WB
BIP	Cell Signalling, #3177	Rabbit	1:1000	WB
Parkina	Abcam, ab15954	Rabbit	1:1000	WB
Mitofusina-2	Abcam, ab56889	Mouse	1:1000	WB
VDAC1	Abcam, ab15895	Rabbit	1:1000	WB
DLP1	BD Biosciences (611112)	Mouse	1:1000	WB
OPA1	BD Biosciences (612606)	Mouse	1:1000	WB
PINK-1	Novusbio (BC100-494)	Rabbit	1:1000	WB
TOMM20	Abcam, ab56783	Mouse	1:75	IF
HADHA	Abcam, ab54477	Rabbit	1:75	IF
p62	Progen Biotechnik	Guinea pig	1:75	IF
β-actina	Sigma-Aldrich, A2228	Mouse	1:5000	WB
α-tubulina	Sigma-Aldrich, T6199	Mouse	1:5000	WB
GAPDH	Sigma-Aldrich, G8795	Mouse	1:5000	WB

Tabla 3.10. Listado de anticuerpos primarios (continuación).

Anticuerpo	Casa comercial	Conjugado	Dilución	Uso
Sheep anti-rabbit	GE Healthcare	HRP	1:5000	WB
Sheep anti-mouse	GE Healthcare	HRP	1:5000	WB
Donkey anti-goat	Santa Cruz	HRP	1:10000	WB
Rabbit anti-guinea pig	Abcam	HRP	1:7000	WB
Donkey anti-rabbit	GE Healthcare	HRP	1:500	IHC
Donkey anti-mouse	Invitrogen	Alexa Fluor 488	1:100	IF
Donkey anti-rabbit	Invitrogen	Alexa Fluor 488	1:100	IF
Donkey anti-guinea pig	Jackson ImmunoResearch	Texas Red	1:100	IF

Tabla 3.11. Listado de anticuerpos secundarios.

RESULTADOS

4.1 IMPORTANCIA DEL RECEPTOR DE IGF1 EN EL DESARROLLO Y FUNCIONALIDAD DEL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN Y SU PAPEL EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS GLUCÍDICA.

4.1.1 Generación y caracterización del modelo BATIGFIRKO.

Con el fin de estudiar el papel del receptor de IGF1 en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón, se generaron ratones que presentaban una delección del exón 3 del receptor de IGF1 en el tejido adiposo marrón. Para ello se cruzaron animales *Igf1r*^{loxP/loxP}, (portadores del exón 3 flanqueado por secuencias loxP) cedidos mediante la co-

laboración con C.R Kahn, con animales *Igf1r*^{loxP/loxP} *Ucp1-Cre*^{+/-} (portadores del gen de la recombinasa Cre bajo la acción del promotor de *Ucp1* específico de tejido adiposo marrón). El resultado de este cruce fue la generación del modelo BATIGFIRKO (Figura 4.1).

A continuación, se comprobó mediante PCR de ADNc obtenido de tejido adiposo marrón de ratones *Igf1r*^{loxP/loxP} (los cuales fueron utilizados siempre como controles o *wild-type*) y ratones BATIGFIRKO, si la delección del exón 3 del *Igf1r* había tenido lugar. Así se observó que los animales WT presentaron una banda de 398pb (formada por 313pb procedentes del exón 3 del *Igf1r* más las pares de bases de las secuencias loxP que lo flanquean) mientras que los ratones KO presentaron únicamente una banda de 85pb, como resultado de la escisión del exón 3 (Figura 4.2 A).

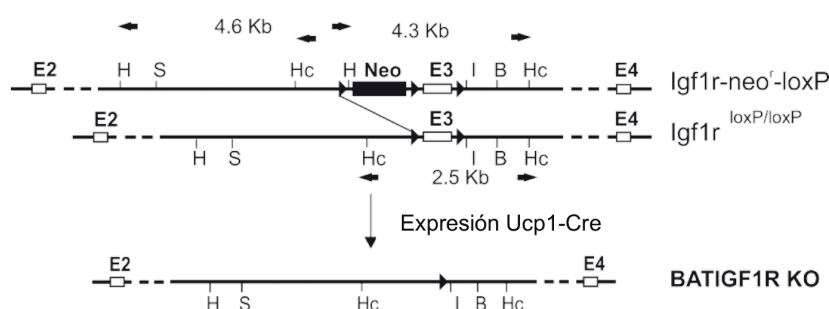


Figura 4.1. Representación esquemática de la generación del modelo BATIGIRKO.

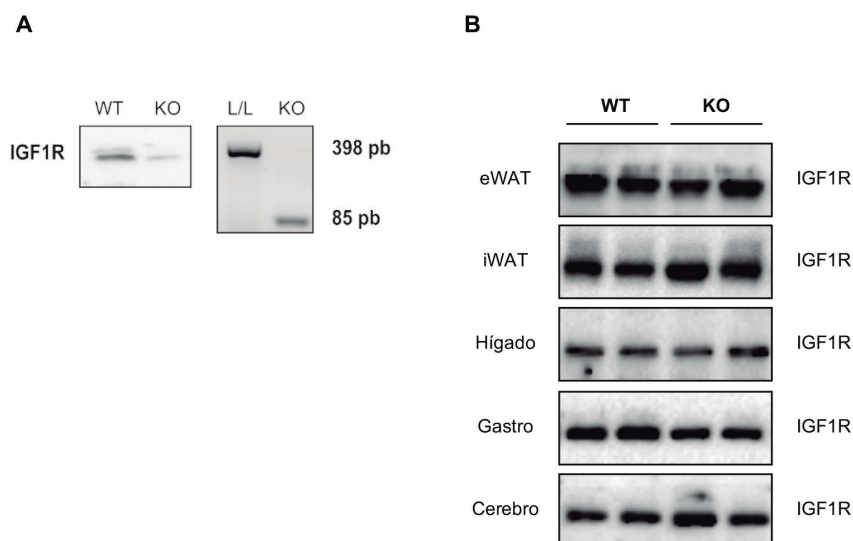


Figura 4.2. **A:** En el panel de la izquierda se observa una imagen representativa de *Western blot* de IGF1R en tejido adiposo marrón. En el panel derecho se observa el resultado de la PCR que detecta la delección del exón 3 del IGF1R en ADNc extraído del tejido adiposo marrón. **B:** *Western blot* representativos de la proteína IGF1R en distintos tejidos de animales de 3 meses de edad (n=4 WT, n=4 DKO).

Por otra parte, se corroboró por *Western blot* la ausencia del IGF1R en tejido adiposo marrón (Figura 4.2 A) y su presencia en diferentes tejidos como eWAT, iWAT, Hígado, Gastrocnemio (tipo de músculo esquelético) y Cerebro (Figura 4.2 B) lo cual demostró que la delección del IGF1R tuvo lugar de manera específica de tejido.

Tras comprobar que la delección del IGF1R solo tuvo lugar en el BAT como estaba previsto, el siguiente paso fue estudiar si la ausencia de este receptor podría influir en el peso corporal de los ratones, ya que como se explicó anteriormente la función termogénica del BAT es un componente fundamental en la regulación del balance energético en roedores.

Para ello se evaluó el peso de los ratones desde su destete a las 4 semanas hasta la semana 52 de desarrollo. Los resultados nos indicaron que no existen diferencias en el peso corporal entre animales WT y animales KO a lo largo de su desarrollo (Figura 4.3).

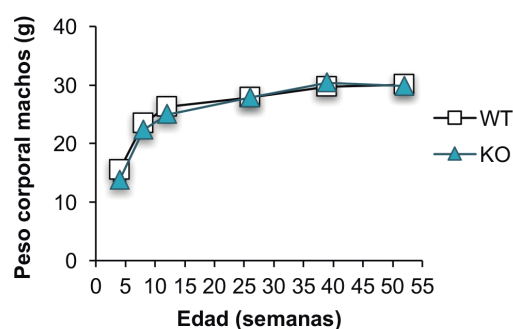


Figura 4.3. Gráfica que representa la evolución del peso corporal de ratones WT (n=38) y KO (n=40) desde la semana 4 (destete) hasta la semana 52 de desarrollo.

4.1.2 Papel del IGF1R en el desarrollo y en la función termogénica del BAT.

Resultados previos en nuestro laboratorio con preadipocitos marrones fetales procedentes del *knockout* constitutivo del IGF1R, demostraron la importancia de este receptor tanto en el proceso adipogénico como en el termogénico. Por ello, tras la generación del

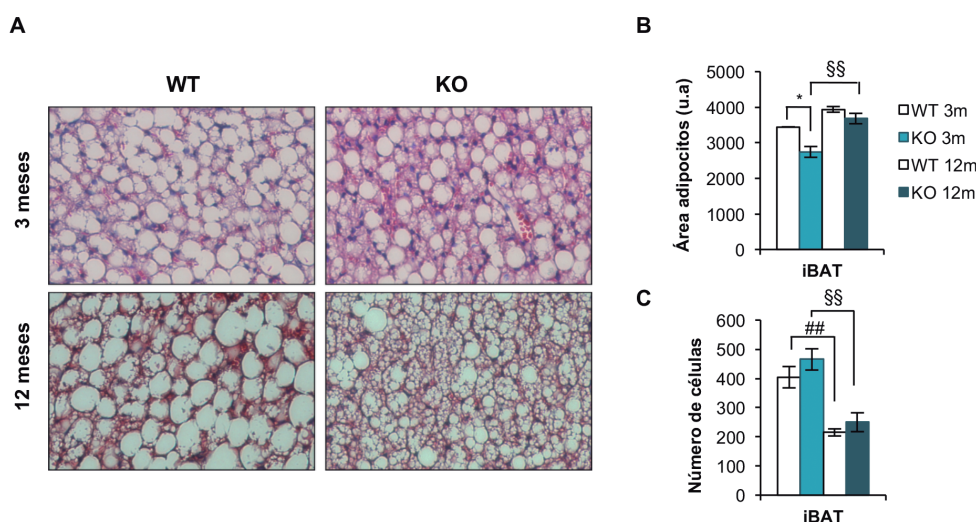


Figura 4.4. **A:** Imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina de cortes de BAT de ratones WT (n=3 por grupo) y KO (n=3 por grupo) de 3 y 12 meses tomadas con un objetivo 20X. **B:** Cuantificación del área de los adipocitos marrones medido en unidades arbitrarias. Se cuantificaron 200 adipocitos por ratón. **C:** Cuantificación del número de adipocitos marrones. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05 entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses, ## P<0,01 entre grupos WT y §§ P<0,01 entre grupos KO.

modelo BATIGFIRKO nos planteamos estudiar qué papel jugaba este receptor en el desarrollo y funcionalidad del BAT.

En primer lugar, se realizó un estudio histológico del BAT en ratones de 3 y a 12 meses de edad. Para ello, tras obtener secciones de BAT incluidas en parafina se realizó una tinción con hematoxilina y eosina con la finalidad de comprobar la morfología de las células. Las imágenes obtenidas nos indicaron que a los 3 meses ya se observaba una ligera pérdida de las gotas lipídicas de gran tamaño en los ratones KO, siendo esta evidencia mucho más visible a los 12 meses (Figura 4.4 A). Tras realizar estas observaciones, se decidió realizar un estudio del tamaño y el número de los adipocitos marrones presentes en dichas imágenes.

Así se observó que el BAT de ratones KO de 3 meses de edad presentaban adipocitos más pequeños y como resultado de ello el número de adipocitos contabilizados fue mayor. A

los 12 meses, no se observaron diferencias en el tamaño ni en el número de adipocitos entre ratones WT y KO. Sin embargo, se observó que los adipocitos marrones KO presentaron un mayor tamaño a los 12 meses en comparación con los 3 meses (Figura 4.4 B, C).

Para evaluar si la pérdida de las gotas lipídicas de gran tamaño en animales KO se debía a un aumento de la Lipólisis, se realizó un ensayo de Lipólisis *ex vivo*. Los resultados indicaron una mayor Lipólisis en animales KO tanto a 3 como a 12 meses (Figura 4.5 A). Por otra parte, de manera paralela a los estudios histológicos, también se cuantificó el peso del BAT(mg) relativizado al peso corporal de los animales (g). Este estudio, tuvo como finalidad analizar si la ausencia del receptor de IGF1 en el tejido adiposo marrón, podría afectar al desarrollo normal del tejido ya que se conoce que el IGF1 es un importante factor de crecimiento para el mismo. Los resultados no mostraron diferencias en el peso del tejido entre animales WT y DKO

de 3 y 12 meses de edad (Figura 4.5 B). Para comprobar si la función termogénica podría estar afectada, en primer lugar, se comprobaron los niveles proteicos de UCP1. Los resultados indicaron menores niveles de UCP1 en los ratones KO tanto a 3 como a 12 meses (Figura 4.5 C).

Tras observar una disminución significativa de los niveles de UCP1 en los animales KO, se decidió comprobar si la función termogénica estaba afectada en estos animales. Para

ello, tras mantener a los animales durante tres días a termoneutralidad (28 °C), con el fin de desactivar a la proteína UCP1 que se encuentra normalmente activa bajo las condiciones de temperatura habituales de los animalarios (23 °C), los animales se pusieron en la cámara fría que se encuentra a una temperatura de entre 4-6 °C durante 12 horas. Durante este periodo se tomaron mediciones regulares de la temperatura corporal de los ratones mediante el uso de una sonda rectal. Los resultados indicaron que los ani-

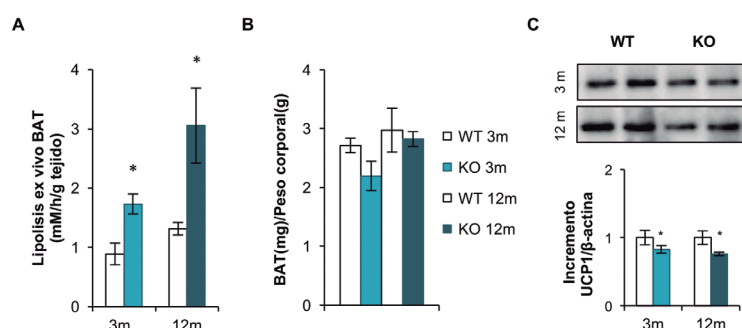


Figura 4.5. **A:** Análisis de Lipólisis ex vivo en BAT de ratones WT y KO de 3 y 12 meses. Para el análisis se utilizaron 4 animales por cada grupo. **B:** Cuantificación del peso del BAT (mg) en función del peso corporal del animal (g) en ratones WT (n=5 por grupo) y KO (n=6 por grupo). **C:** Blots representativos de la proteína UCP1 en el BAT de ratones WT (n=6 a 3 meses, n=5 a 12 meses) y KO (n=5 por grupo) de 3 y 12 meses de edad y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses.

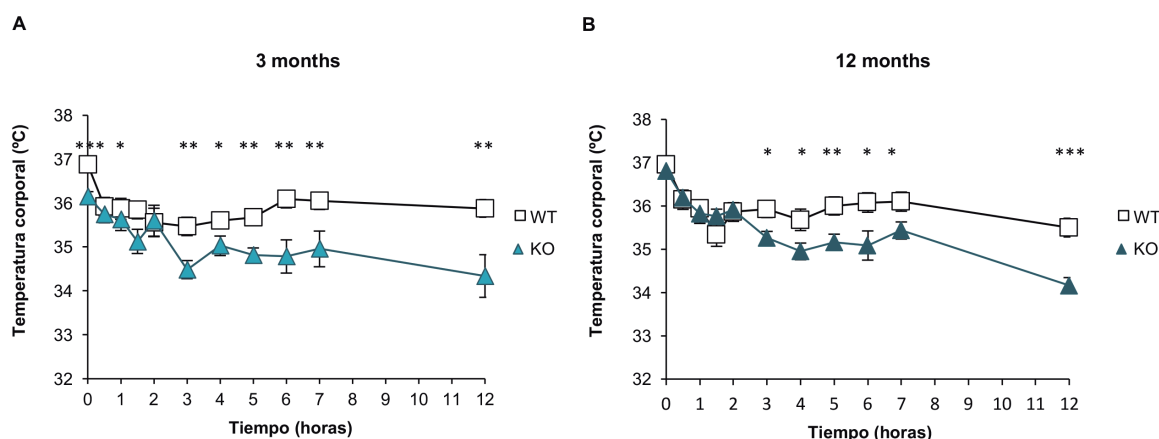


Figura 4.6. **A:** Gráfica donde se representan los resultados de los experimentos de exposición al frío en animales WT (n=8) y KO (n=6) de 3 meses. La gráfica muestra la temperatura corporal de los animales durante las 12h de duración del experimento. **B:** Gráfica donde se representan los resultados de los experimentos de exposición al frío en animales WT (n=5) y KO (n=11) de 12 meses. Los resultados se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses.

males KO tanto de 3 como de 12 meses presentaban un moderado defecto termogénico observándose una diferencia de temperatura de aproximadamente 1,5 °C entre ambos tras 12 horas de exposición al frío (Figura 4.6 A y B).

Dado el defecto termogénico observado en ratones KO, se decidió evaluar los niveles de ARNm y niveles proteicos de UCP1 en el BAT de ratones mantenidos en condiciones de termoneutralidad (Ct) o tras 4 o 12h de exposición al frío. En el caso de los niveles de ARNm, se observó un aumento de UCP1 inducido por el frío tanto en WT como en KO (Figura 4.7 A). Sin embargo, en relación a los niveles proteicos, se observó un aumento mayor de los niveles de UCP1 tras 4h de exposición al frío en los ratones WT en comparación con los KO (Figura 4.7 B).

En este mismo sentido, a la vista de los resultados, se realizaron experimentos de jaulas metabólicas, en los cuales se midieron la ingesta de alimento diaria, el volumen de oxígeno y calor producidos en los periodos de luz y oscuridad. Los resultados no indicaron diferencias en la ingesta entre los animales WT y KO de 3 y de 12 meses (Figura 4.8 A). Tanto en el periodo de luz como en el de oscuridad, se observó un menor consumo de oxígeno y una menor producción de calor en los animales de edad más avanzada. Además, los animales KO de 3 meses mostraron un menor consumo de oxígeno y una menor producción de calor en el periodo de oscuridad (periodo en el que los animales presentan una mayor actividad) (Figura 4.8 B, C).

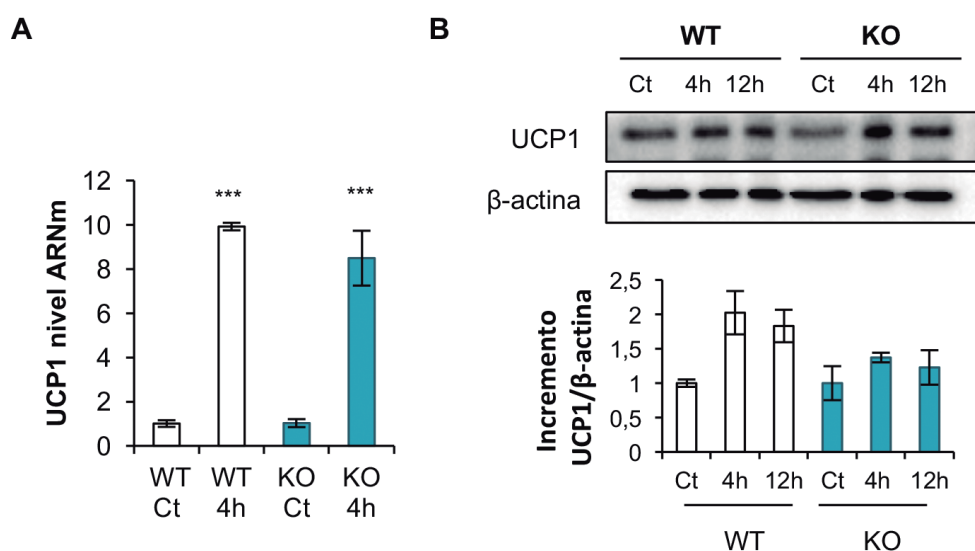


Figura 4.7. **A:** Niveles de ARNm de UCP1 en BAT de ratones de 3 meses WT (n=4 por grupo) y KO (n=4 por grupo) en condiciones de termoneutralidad o tras 4h de exposición al frío. **B:** Blot representativo de la proteína UCP1 en el BAT de ratones de 3 meses WT (n=2 por grupo) y KO (n=2 por grupo) en condiciones de termoneutralidad y tras 4 o 12 h de exposición al frío y su correspondiente cuantificación. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** P<0,001 entre grupos Ct y 4h.

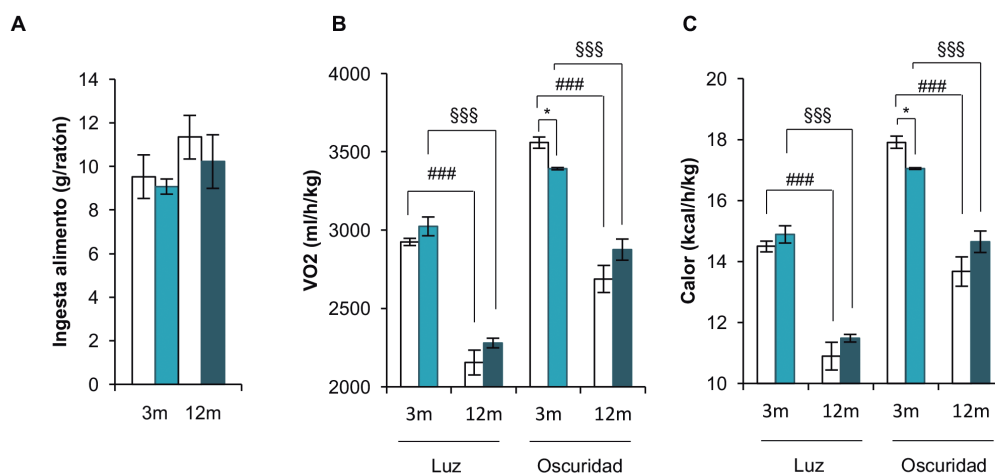


Figura 4.8. A: Ingesta de alimento diaria de dieta estándar en ratones WT (n=4 por grupo) y KO (n=4 por grupo) de 3 y 12 meses B: Volumen de oxígeno consumido en ratones WT (n=4 por grupo) y KO (n=4 por grupo) de 3 y 12 meses en el periodo de luz y en el de oscuridad. C: Calor producido en ratones WT (n=4 por grupo) y KO (n=4 por grupo) de 3 y 12 meses en el periodo de luz y en el de oscuridad. Los resultados se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses, ### $P<0,001$ entre grupos WT y \$\$\$ $P<0,001$ entre grupos KO.

El siguiente paso, fue el estudio de posibles mecanismos compensatorios ante la ausencia del IGF1R. Para ello se analizaron distintas proteínas implicadas en la señalización de la insulina, en la funcionalidad mitocondrial y en la vía de BMP7, mediante *western blot*.

Se decidió estudiar la vía de señalización de la insulina, ya que resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que siempre que se deletó el IR o el IGF1R en distintos tipos celulares como hepatocitos o células β pancreáticas, se observaron aumentos compensatorios del otro receptor. Así, en nuestro modelo animal se observó una tendencia a aumentar la cantidad de IR en ratones KO de 12 meses que no llegó a alcanzar la significatividad estadística (Figura 4.9).

Además del IR, se decidieron analizar proteínas fundamentales en la vía de la señalización de la insulina como son IRS1, IRS2 y PI3K. Los resultados indicaron un gran aumento de la proteína IRS1 y un ligero aumento de IRS2 en animales KO a 3 y a 12 me-

ses. Sin embargo, en relación a PI3K solo se observó un aumento significativo en ratones KO a los 12 meses (Figura 4.9).

A continuación, se evaluaron los niveles proteicos de la enzima HSL para corroborar los resultados observados en los experimentos de Lipolisis *ex vivo*. Como se esperaba, los resultados indicaron un aumento de la proteína HSL en los ratones KO tanto a 3 como a 12 meses. En relación a la funcionalidad termogénica, se decidió estudiar los niveles del transportador de carnitina, imprescindible para el transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria, y para la correcta funcionalidad de la proteína UCP1. En este sentido se observó un aumento de los niveles de CPTI-M en ratones KO tanto a 3 como a 12 meses. Para estudiar el contenido mitocondrial se decidió evaluar las proteínas HSP60 y Citocromo C. Los resultados indicaron un aumento de HSP60 en animales KO a los 3 meses mientras que en el caso del Citocromo C solo se encontró un aumento en animales KO de 12 meses (Figura 4.10).

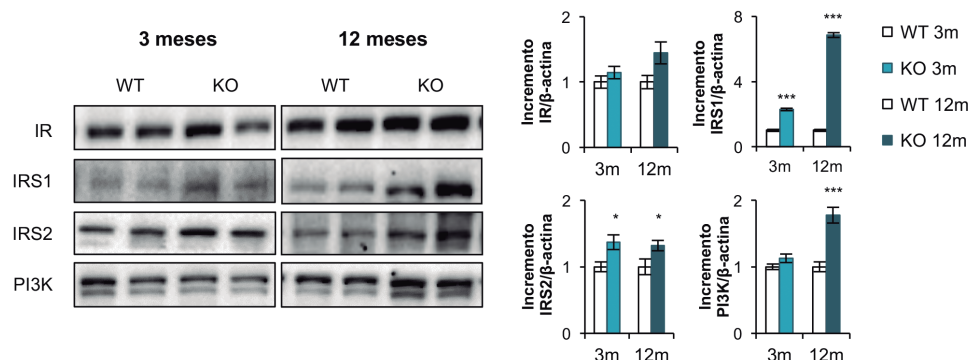


Figura 4.9. Blots representativos de las proteínas IR, IRS1, IRS2 y PI3K en el BAT de ratones WT ($n=6$ a 3 meses, $n=5$ a 12 meses) y KO ($n=5$ por grupo) de 3 y 12 meses de edad y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; *** $P<0,001$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses.

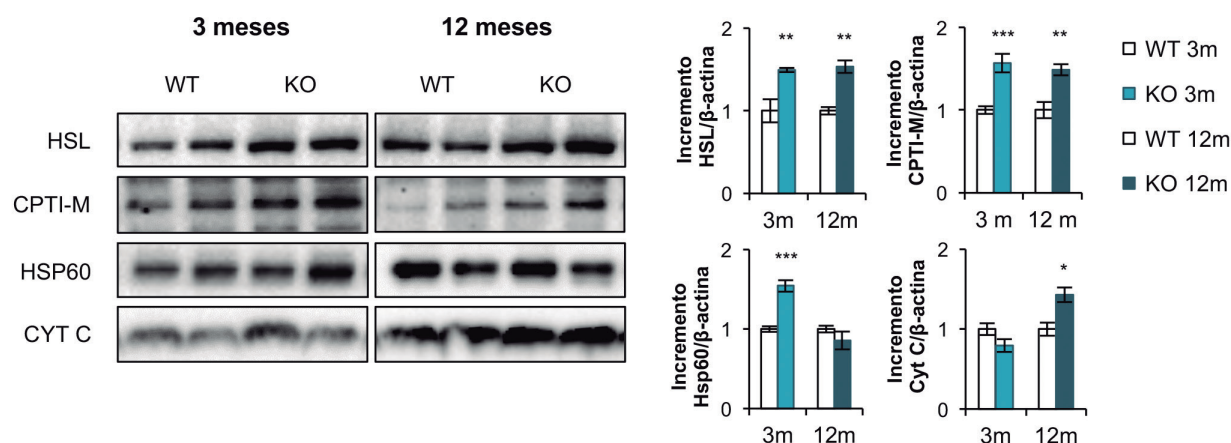


Figura 4.10. Blots representativos de las proteínas HSL, CPT1-M, HSP60 y CYT C en el BAT de ratones WT ($n=6$ a 3 meses, $n=5$ a 12 meses) y KO ($n=5$ por grupo) de 3 y 12 meses de edad y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses.

Para evaluar otras posibles vías de señalización que pudieran estar aumentadas como compensación a la falta del IGF1R, además de la señalización de insulina estudiada anteriormente, se decidió analizar la vía de señalización del BMP7. Es conocido que el factor BMP7 tiene una función muy importante durante la diferenciación de los adipocitos marrones, por lo que se consideró que el estudio de su señalización podría albergar resultados interesantes. Por estos motivos,

se decidió estudiar los niveles proteicos de: BMP7 tanto su precursor como la forma madura, se estudió a ACVR1 (receptor de Activina A tipo I) como un representante dentro de sus posibles receptores y, por último, se analizaron los niveles de la proteína transductora p-Smad 1/5/8 específica de la señalización por BMP7.

Los resultados nos indicaron una disminución considerable de los niveles de la forma

madura de BMP7 en ratones KO a los 3 meses, los cuales se recuperaron hasta casi alcanzar los niveles de los animales WT a los 12 meses. En el caso del receptor ACVR1 se observó un aumento de los niveles proteicos en animales KO a los 12 meses. En el caso de la proteína transductora de señales, p-Smad 1/5/8, a los tres meses se encontró una disminución significativa que se correlaciona con los bajos niveles de BMP7, mientras que a los 12 meses sus niveles estaban aumentados significativamente (Figura 4.11).

En último lugar, tras el análisis de diversos componentes proteicos que forman parte de posibles vías de señalización alternativas, se decidió estudiar los niveles de ARNm de distintos genes en el BAT de estos animales: *Slc2a4* (Glut4, transportador de glucosa), *Prdm16* (factor transcripcional fundamental para la diferenciación de los adipocitos marrones), *Usp15* (desubiquitinasa de la proteína p-Smad 1/5/8), *Dio2* (desyodasa necesaria para la formación de hormona tiroidea T3), *Lep* (Leptina), *Adipoq* (Adiponectina),

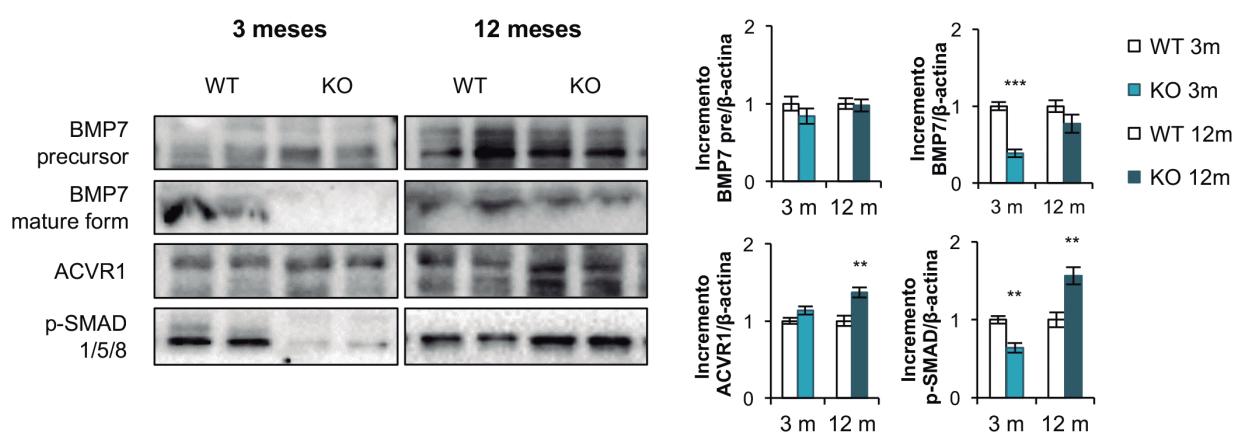


Figura 4.11. Blots representativos de las proteínas BMP7 (precursor y forma madura), ACVR1 (receptor de tipo I de BMP7) y p-Smad 1/5/8 (proteína transductora de señales específica de BMP7) en el BAT de ratones WT ($n=6$ a 3 meses, $n=5$ a 12 meses) y KO ($n=5$ por grupo) de 3 y 12 meses de edad y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses.

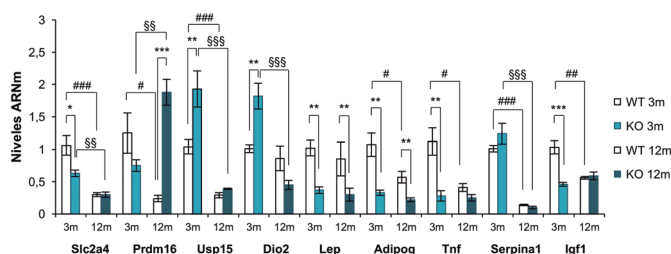


Figura 4.12. Niveles de ARNm de los genes *Slc2a4*, *Prdm16*, *Usp15*, *Dio2*, *Lep*, *Adipoq*, *Tnf*, *Serpina1* e *Igf1* en ratones WT ($n=5$ de 3 meses, $n=6$ de 12 meses) y KO ($n=5$ por grupo) de 3 y 12 meses. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses, # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ entre grupos WT y §§ $P<0,01$; §§§ $P<0,001$ entre grupos KO.

Tnf, *Serpina 1* (PAI-1, inhibidor del activador de plasminógeno asociado a daño vascular) e *Igf1*. Los ratones KO a los 3 meses, mostraron menores niveles de *Slc2a*, *Lep*, *Adipoq*, *Tnf* e *Igf1* y unos niveles aumentados de *Dio2*. Por otra parte, los ratones KO a los 12 meses, mostraron unos niveles aumentados de *Prdm16* y una disminución de *Lep* y *Adipoq*. Cuando se comparó la evolución de la expresión de estos genes con la edad, se observó que en los animales WT hubo una disminución de *Slc2a*, *Prdm16*, *Usp15*, *Adipoq*, *Tnf*, *Serpina 1* e *Igf1* a los 12 meses. En el caso de los animales KO, se observó una disminución de *Slc2a*, *Usp15*, *Dio2*, *Serpina 1* y un aumento de *Prdm16* con la edad.

4.1.3 Efectos de la delección del IGF1R sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal.

Debido a los efectos observados sobre el tejido adiposo marrón, se quiso comprobar si la delección del IGF1R en el BAT, también afectaba de manera secundaria a la marronización de los tejidos adiposos inguinal y epididimal. Para ello se estudió la presencia de UCP1 mediante inmunohistoquímica en los teji-

dos adiposos inguinal (tipo de tejido adiposo subcutáneo donde el proceso de marronización es mayoritario) y epididimal (tipo de tejido adiposo visceral donde en condiciones normales no se observa marronización) de animales WT y KO de 3 y 12 meses. Los resultados únicamente indicaron presencia de UCP1 en el tejido adiposo inguinal de animales WT de 3 y 12 meses, no observándose presencia de adipocitos *beige* en los animales KO (Figura 4.13).

De manera paralela a los ensayos de inmunohistoquímica, se evaluaron los niveles de ARNm de *Prdm16*, así como los niveles proteicos de UCP1 en los distintos compartimentos de tejido adiposo blanco. Los resultados indicaron un aumento de la expresión de *Prdm16* en el iWAT de los ratones KO tanto a 3 como a 12 meses y un aumento de *Prdm16* en el eWAT a los 12 meses. Además, los niveles de *Prdm16* en iWAT fueron menores en los ratones KO de edad más avanzada (Figura 4.14 A). En el caso de los niveles proteicos de UCP1 solo se observó la presencia de esta proteína en el iWAT de ratones WT de 3 y 12 meses (Figura 4.14 B).

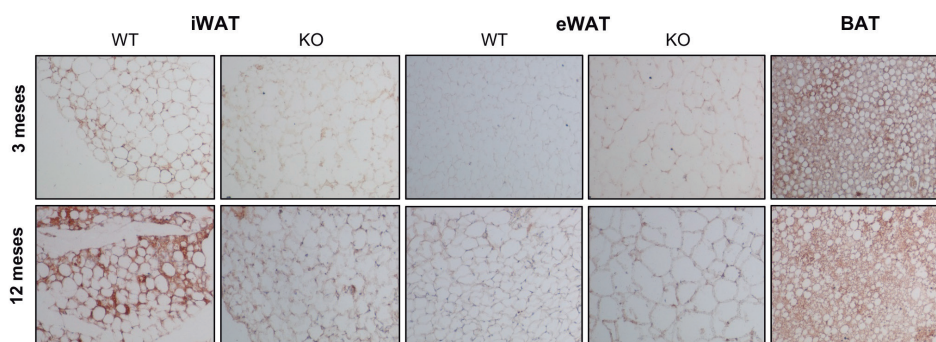


Figura 4.13. Inmunohistoquímica de Ucp1 en cortes de tejidos adiposos inguinal y epididimal en animales WT (n=3 por grupo) y KO (n=3 por grupo) de 3 y 12 meses. Diversos cortes de BAT fueron utilizados como control positivo de la tinción. El proceso de marronización se visualiza como la presencia de pequeñas agrupaciones de células con una disposición de vacuolas lipídicas multilocular teñidas de color marrón. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo 20X.

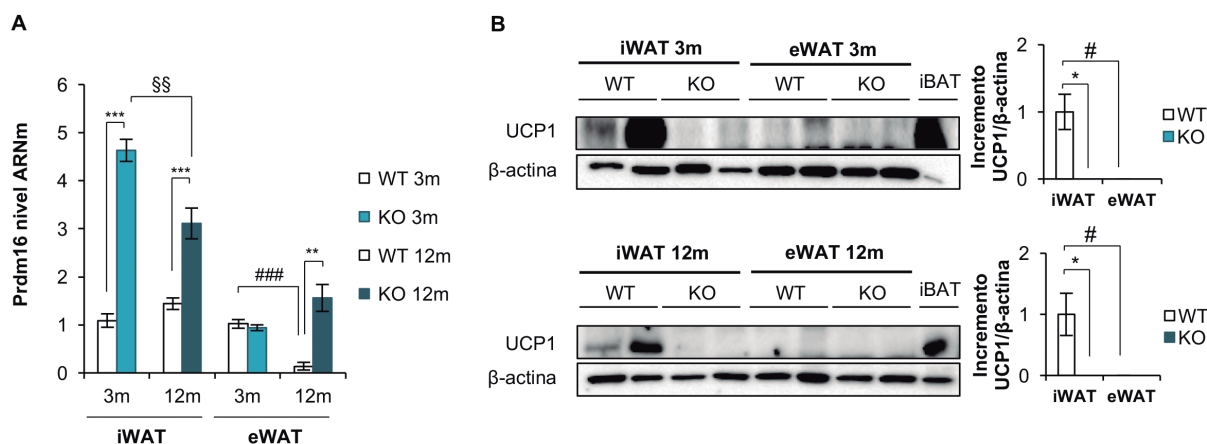


Figura 4.14. A: Niveles de ARNm de *Prdm16* en el tejido adiposo inguinal y epididimal de ratones WT (n=6 de 3 meses, n=4 de 12 meses) y KO (n=4 por grupo) de 3 y 12 meses de edad. Los resultados se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** P<0,01; *** P<0,001 entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses; ### P<0,001 entre grupos WT y KO de 3 meses; §§ P<0,01 entre grupos WT y KO de 12 meses. **B:** Blots representativos de la proteína UCP1 en el tejido adiposo inguinal y epididimal (45μg de carga) de animales WT y KO de 3 y 12 meses (n=3-4 por grupo). En todos los casos 8μg de iBAT fueron usados como control positivo de los niveles de proteína UCP1. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media±SEM. En este caso la significación estadística se valoró mediante la utilización del test no paramétrico Kruskal Wallis ya que se asumió que la distribución de los datos no era normal * P<0,05 entre grupos WT y KO de 3 y 12 meses; # P<0,05 entre grupos WT y KO de 12 meses.

4.1.4 Función del IGF1R en la redistribución del órgano adiposo.

La afectación de la función termogénica de los animales KO, puede ir asociada a una alteración del balance energético y como resultado producir un aumento de la cantidad de grasa del animal o incluso ocasionar obesidad. Para corroborar en qué medida las alteraciones del BAT pueden ocasionar una redistribución del órgano adiposo, en primer lugar, se decidió valorar mediante RMN la cantidad de grasa de los animales WT y KO de 3 y 12 meses de edad. Los resultados no indicaron diferencias entre animales WT y KO ni a 3 ni a 12 meses, observándose únicamente un aumento de la masa grasa con la edad tanto en animales WT como KO (Figura 4.15 A, B). En segundo lugar, para comprobar si estaba teniendo lugar una redistribución de la grasa entre compartimentos subcutáneos y viscerales, independientemente de la

masa grasa total de los animales, se cuantificó el peso de distintos compartimentos grasos viscerales (epididimal, retroperitoneal y mesentérico) y subcutáneos (inguinal). En el compartimento epididimal, únicamente se observó un aumento de masa grasa en los animales WT con la edad mientras que en el compartimento inguinal no se observaron cambios de peso. En el compartimento retroperitoneal se observó un aumento de masa grasa en animales KO a los 3 meses que revirtió con la edad y un aumento de la masa grasa en animales WT con la edad. Por último, en el compartimento mesentérico, solo se observaron aumentos en la masa grasa asociada a la edad tanto en animales WT como KO (Figura 4.15 C).

A continuación, para terminar de estudiar al órgano adiposo, se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina en cortes de distintos compartimentos grasos con la finalidad de

estudiar la morfología y el número de células (Figura 4.16 A). En relación al área de los adipocitos se observó un aumento del tamaño de los adipocitos del eWAT en ratones KO de 12 meses y una disminución del tamaño en ratones WT con la edad. También se observó un aumento de los adipocitos del rWAT en ratones KO tanto de 3 como de 12 meses y un aumento de tamaño en ratones WT con la edad. En el iWAT no se observaron cambios de tamaño y en el mWAT se observó un aumento de tamaño tanto en animales WT como KO asociados a la edad (Figura 4.16 B). En relación al número de células, los adipocitos del eWAT de ratones WT de 12 meses eran más pequeños por lo cual se observó un aumento del número de los mismos, en el caso de ratones KO de 12 meses los adipocitos fueron más grandes y su número fue menor. Por último, el aumento de tamaño de los adipocitos del mWAT de ratones KO con

la edad fue asociado a una disminución del número de células.

En este punto, nos preguntamos si las diferencias observadas en el tamaño de los adipocitos de algunos compartimentos podrían traducirse en una expresión diferencial de adipoquinas entre animales WT y KO. Para ello se evaluaron en el plasma de ratones en estado de alimentación los niveles de leptina, adiponectina (marcadores de adiposidad) y TNF- α (marcador de inflamación local del tejido adiposo) mediante ELISA. Los resultados no mostraron diferencias en los niveles de leptina y adiponectina plasmáticos entre animales WT y KO de 3 y 12 meses. Sin embargo, se observaron menores niveles de TNF- α con la edad en ambos grupos, así como una ligera disminución no significativa en ratones KO de 3 y 12 meses (Tabla 4.1).

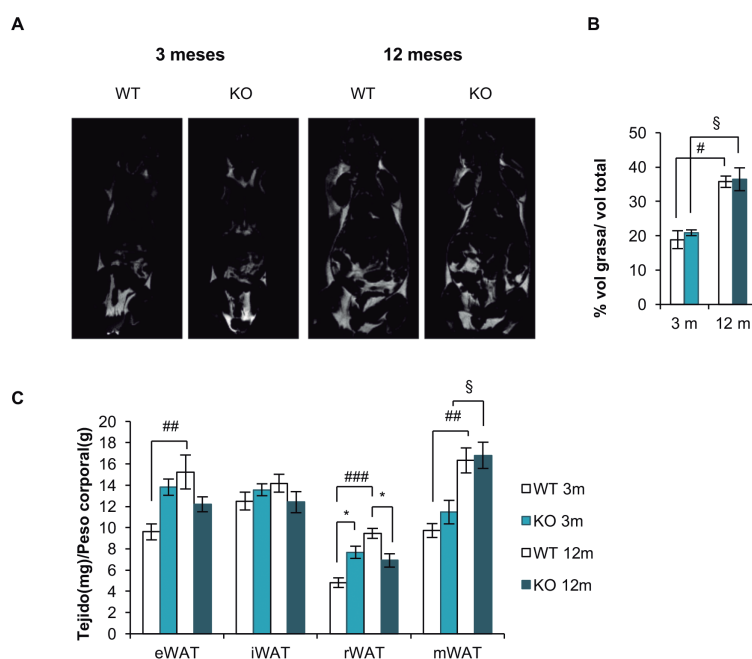


Figura 4.15. **A:** Imágenes de RMN representativas de animales WT y KO de 3 y 12 meses **B:** Cuantificación de las imágenes de RMN de animales WT (n=4 por grupo) y KO (n=4 por grupo) de 3 y 12 meses. **C:** Cuantificación del peso de los tejidos eWAT, iWAT, rWAT y mWAT en función del peso corporal en animales WT (n=12 por grupo) y KO (n=13 por grupo) de 3 y 12 meses. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses; # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ entre grupos WT y § $P < 0,05$ entre grupos KO.

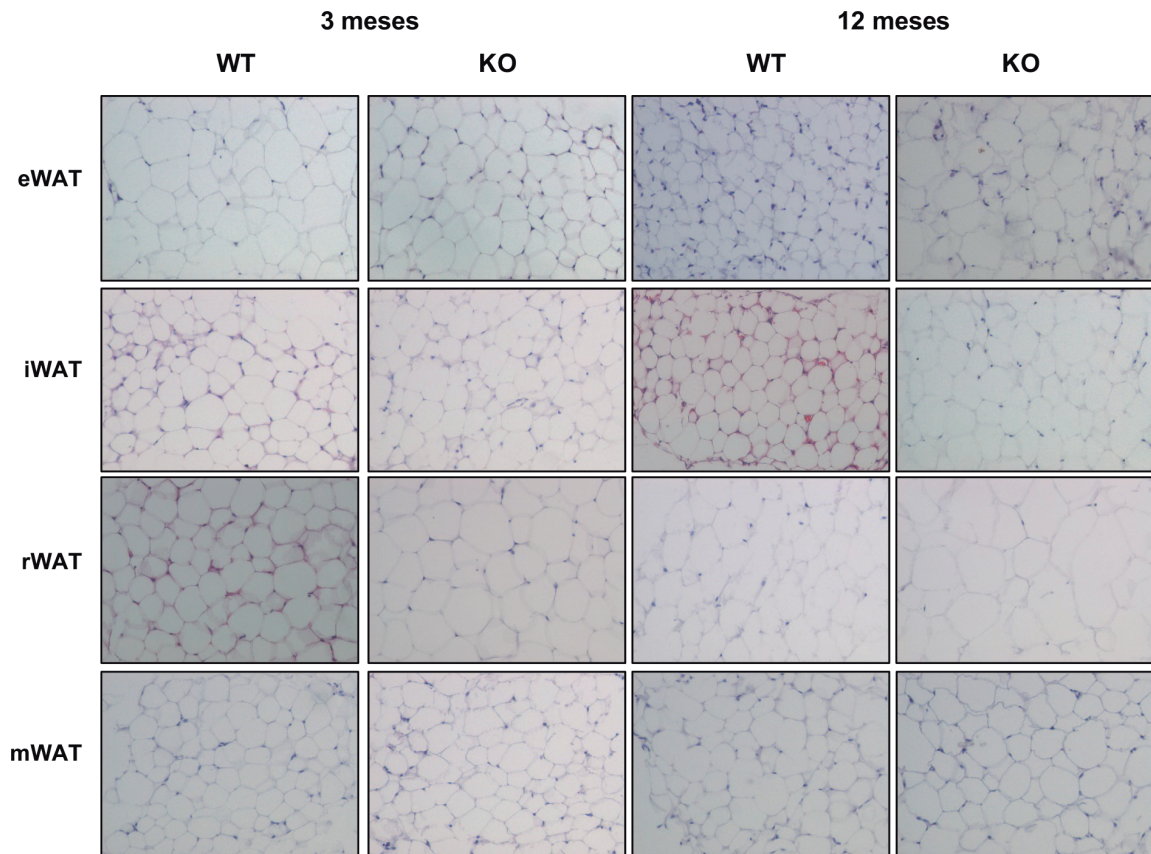
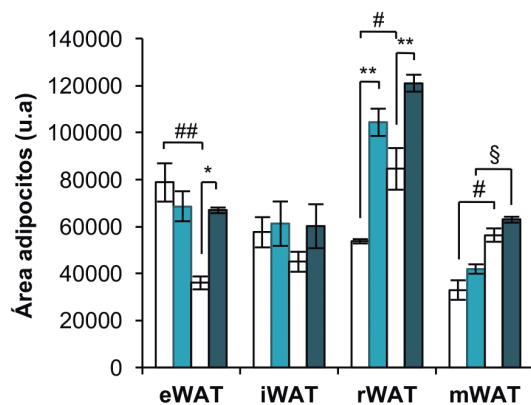
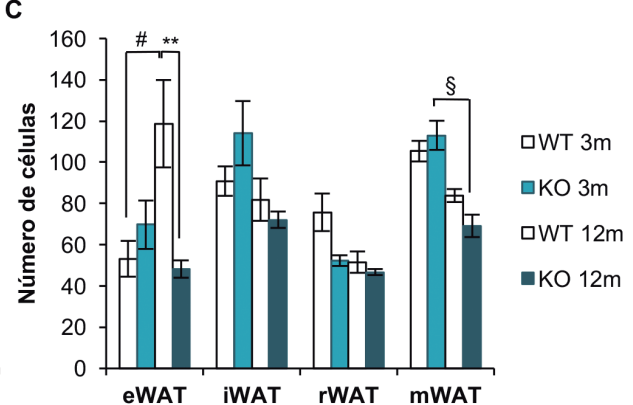
A**B****C**

Figura 4.16. A: Imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina de cortes de eWAT, iWAT, rWAT y mWAT de ratones WT (n=5 por grupo) y KO (n=5 por grupo) de 3 y 12 meses tomadas con un objetivo 20X. **B:** Cuantificación del área de los adipocitos blancos medidos en unidades arbitrarias. Se cuantificaron 250 adipocitos por ratón. **C:** Cuantificación del número de adipocitos blancos. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses, # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ entre grupos WT y § $P < 0,05$ entre grupos KO.

4.1.5 Papel del IGF1R en la homeostasis glucídica y en el estatus endocrino.

Resultados previos en nuestro laboratorio con el modelo BATIRKO, demostraron que la deficiencia del receptor de insulina en el BAT tiene efectos sobre la homeostasis glucídica. En este sentido, debido a la gran homología entre el receptor de insulina y el de IGF1, se decidió estudiar si la ausencia de IGF1 podría estar afectando a la homeostasis glucídica al igual que ocurriría en el caso del modelo BATIRKO. Para ello se realizaron test de tolerancia a la glucosa (GTT), test de tolerancia a la insulina (ITT) y se evaluaron los niveles de glucosa en ayuno y en alimentación en ratones WT y KO de 3 y 12 meses. En el modelo BATIGIRKO, se observó una resistencia a la insulina en animales de edad avanzada ([Figura 4.17 B](#)) sin alteraciones en la tolerancia a la glucosa. Además, se observó un aumento de los niveles de Glucosa en ayunas en ratones KO de 12 meses ([Figura 4.17 A](#)).

Además de los parámetros descritos en el apartado anterior, también se evaluaron los niveles plasmáticos de T3, IGF1, BMP7 (como posibles mecanismos compensatorios) y los niveles de Glucosa, Insulina y triglicéridos. Los resultados mostraron un aumento de los niveles de T3 e IGF1 en ratones KO de 12 meses, así como un aumento de los niveles entre ratones KO de 3 y 12 meses. En relación al BMP7 se observó un aumento de sus niveles en animales WT con la edad y una disminución en animales KO de 12 meses. También se observó un ligero aumento de los niveles de insulina en animales KO tanto a 3 como a 12 meses que no llegó a alcanzar la significatividad estadística. Por último, se observó una hipertrigliceridemia en animales KO tanto a 3 como a 12 meses ([Tabla 4.1](#)).

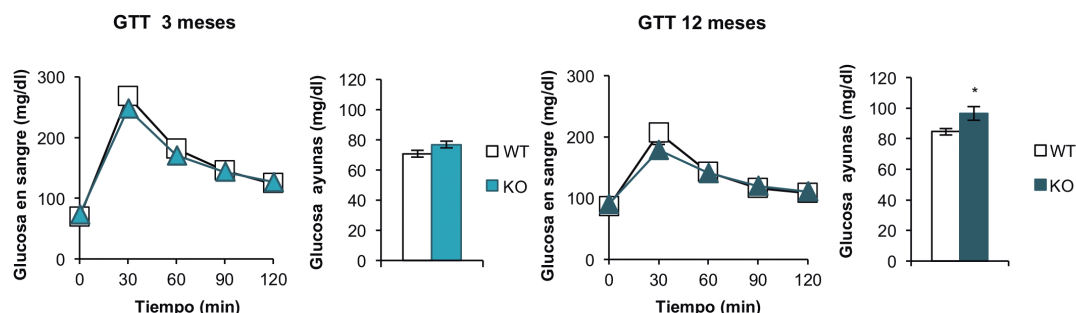
Debido a la resistencia a la insulina observada en animales KO de 12 meses, el siguiente

paso fue estudiar la señalización de la insulina tanto en el propio tejido adiposo marrón como en tejidos periféricos (iWAT, eWAT, hígado, Gastrocnemio y corazón). Para ello se inyectó 1U/Kg de insulina o solución salina a animales alimentados y tras 15 min se procedió a la extracción de los distintos tejidos. Los resultados mostraron una mayor sensibilidad a la insulina en el iWAT de animales KO de 12 meses, mientras que no se observaron diferencias entre ratones WT y KO en el eWAT e iBAT ([Figura 4.18](#)).

En el caso del hígado, se observó una menor señalización de la insulina en ratones KO de 12 meses ([Figura 4.19 A](#)). Este hecho nos llevó a estudiar un posible depósito ectópico de lípidos en el tejido. Para ello, se realizó una tinción con hematoxilina y eosina para comprobar la morfología de los hepatocitos y una tinción de los lípidos con Oil Red O en distintos cortes de hígado, donde los lípidos aparecieron teñidos de color rojo. La tinción nos reveló un aumento significativo de la cantidad de lípidos en los ratones KO de 12 meses en comparación con ratones WT ([Figura 4.19 B](#)).

Por último, en el caso del músculo esquelético y el corazón, no se observaron diferencias en la señalización de insulina entre animales WT y KO ([Figura 4.20](#)).

A



B

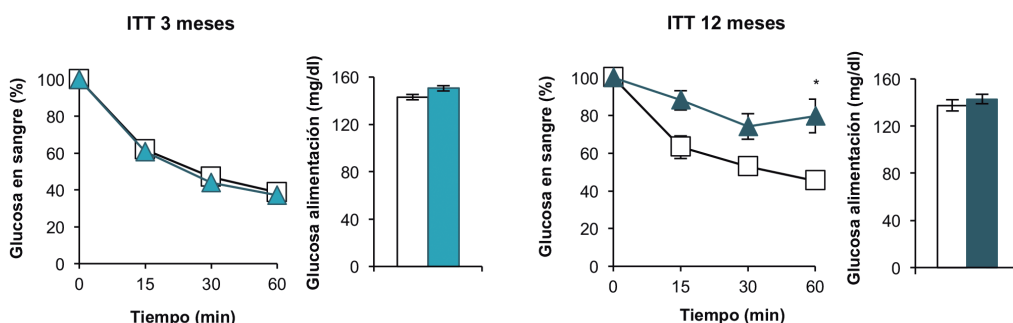


Figura 4.17. A: Test de tolerancia a la glucosa (GTT) y valoración de los niveles de Glucosa en ayunas en animales WT ($n=17$ de 3 meses, $n=10$ de 12 meses) y KO ($n=15$ de 3 meses y $n=8$ de 12 meses) de 3 y 12 meses. **B:** Test de tolerancia a la insulina (ITT) y valoración de los niveles de Glucosa en alimentación en animales WT ($n=17$ de 3 meses, $n=10$ de 12 meses) y KO ($n=15$ de 3 meses y $n=8$ de 12 meses) de 3 y 12 meses. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado en el caso de los valores de Glucosa en ayunas fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses. En el caso de la ITT a 12 meses se aplicó un Anova de dos vías seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$ entre grupos WT y KO de 3 o 12 meses.

	WT 3m	KO 3m	WT 12m	KO 12m
T3 (ng/ml)	0,49 \pm 0,04	0,56 \pm 0,03	0,53 \pm 0,05	0,76 \pm 0,03 ^{a, g}
IGF-1 (ng/ml)	141,88 \pm 24,05	111,05 \pm 18,69	113,51 \pm 13,29	257,73 \pm 36,83 ^{b, g}
BMP7 (pg/ml)	2,44 \pm 0,29	1,99 \pm 0,17	4,22 \pm 0,55 ^d	2,45 \pm 0,30 ^a
Insulina (ng/ml)	0,75 \pm 0,05	1,44 \pm 0,27	1,17 \pm 0,17	1,31 \pm 0,12
Glucosa (mg/dl)	143,06 \pm 3,17	150,48 \pm 3,01	137,62 \pm 4,76	143 \pm 3,99
TG (mg/dl)	72,96 \pm 6,64	104,52 \pm 12,58 ^a	65,21 \pm 10,85	133,41 \pm 26,56 ^a
Leptina (ng/ml)	2,74 \pm 0,51	2,58 \pm 0,45	2,05 \pm 0,45	3,00 \pm 0,38
Adiponectina (ng/ml)	23,93 \pm 0,58	22,94 \pm 0,54	21,36 \pm 1,12	21,74 \pm 0,76
TNF- α (pg/ml)	2,63 \pm 0,37	1,01 \pm 0,1	0,83 \pm 0,09 ^d	0,67 \pm 0,06

Tabla 4.1. Estatus metabólico y endocrino en animales alimentados WT ($n=5-9$) y KO ($n=4-9$) de 3 y 12 meses de edad. Los resultados se representan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas: ^a $P<0,05$; ^b $P<0,01$; ^c $P<0,001$ entre grupos WT y KO de 3 y 12 meses. ^d $P<0,05$; ^e $P<0,01$; ^f $P<0,001$ entre grupos WT, ^g $P<0,05$; ^h $P<0,01$; ⁱ $P<0,001$ entre grupos KO.

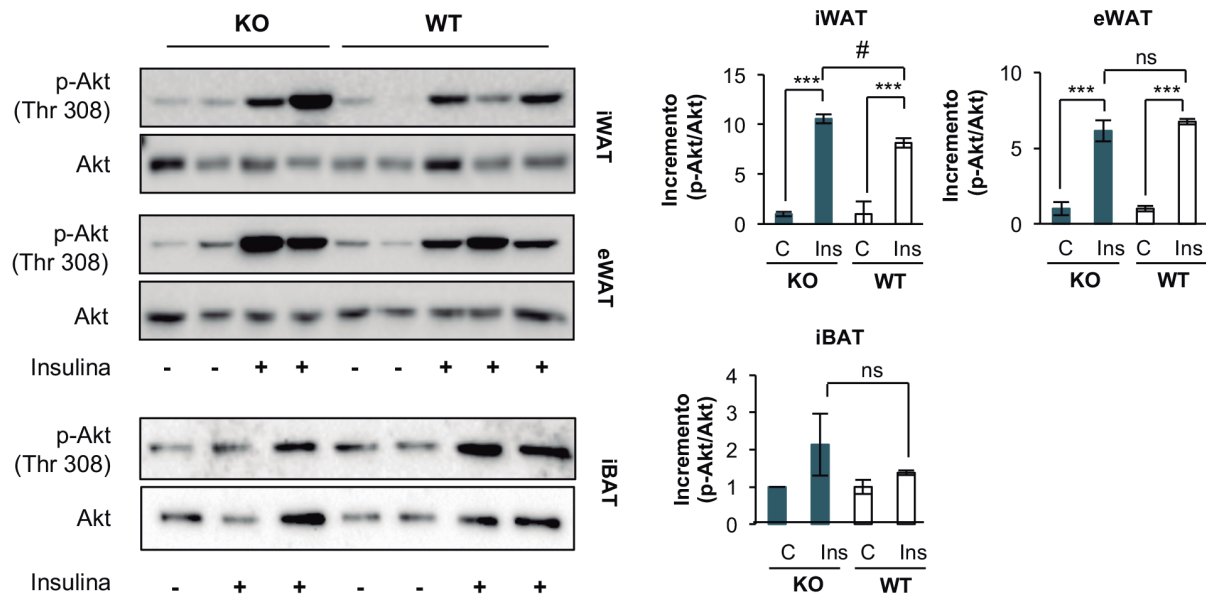


Figura 4.18. Blots representativos de las proteínas p-Akt (Thr308) y Akt en iWAT, eWAT e iBAT de animales WT (n=5 en iWAT e eWAT, n=4 en iBAT) y KO (n=4 en iWAT e eWAT, n=3 en iBAT) de 12 meses. Los resultados de la cuantificación del incremento de p-Akt/Akt se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** P<0,001 entre grupos control e insulina de animales WT y KO, # P<0,05 entre grupos insulina de animales WT y KO

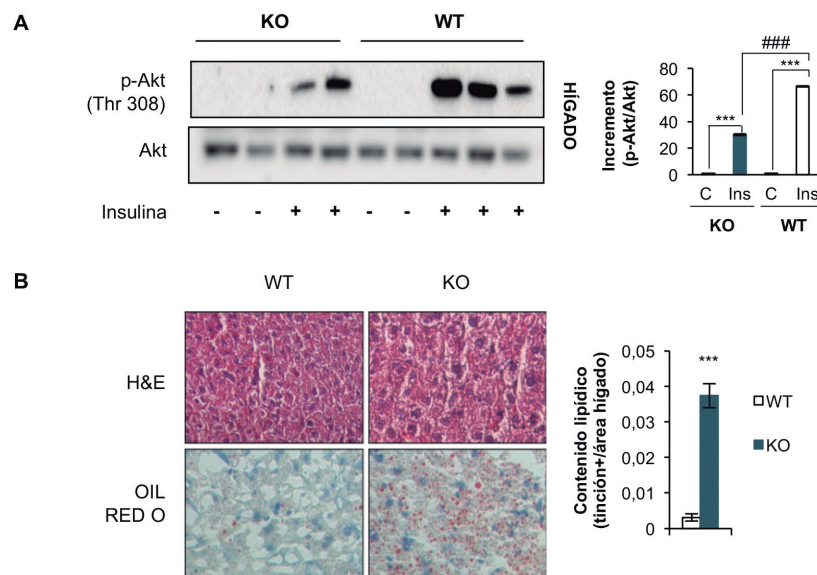


Figura 4.19. A: Blot representativo de las proteínas p-Akt (Thr308) y Akt en hígado de animales WT (n=5) y KO (n=4) de 12 meses. Los resultados de la cuantificación del incremento de p-Akt/Akt se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** P<0,001 entre grupos control e insulina de animales WT y KO, ### P<0,001 entre grupos insulina de animales WT y KO. **B:** Imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina (paneles superiores) e imágenes de la tinción Oil Red O (paneles inferiores) en cortes de hígado de ratones WT (n=5) y KO (n=4) de 12 meses tomadas con un objetivo 20X y su correspondiente cuantificación. Los resultados fueron expresados como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de *Student*. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** P<0,001 entre grupos WT y KO.

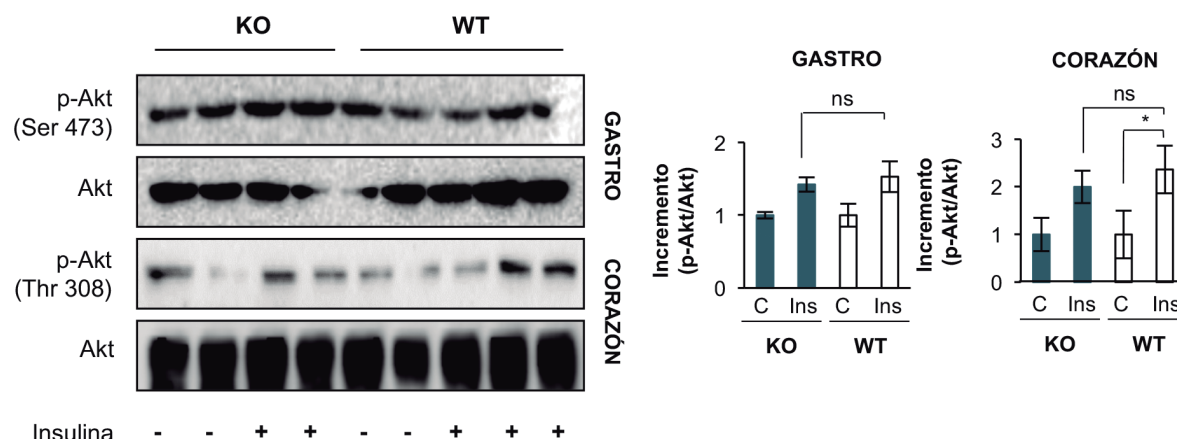


Figura 4.20. Blots representativos de las proteínas p-Akt (Thr308) y Akt en GASTRO y corazón de animales WT (n=5) y KO (n=4) de 12 meses. Los resultados de la cuantificación del incremento de p-Akt/Akt se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$ entre grupos control e insulina de animales WT y KO.

4.1.6 Efectos de la delección del IG-F1R en el BAT sobre las proteínas desacoplantes de tejidos periféricos y su papel protector frente a la dieta grasa.

Tras observar que el fallo termogénico en el tejido adiposo marrón y en los adipocitos *beige* en los animales KO fue debido a una pérdida de la proteína UCP1, nos preguntamos si este hecho podría afectar a la expresión de otras proteínas desacoplantes presentes en tejidos como hígado, Gastrocnemio y corazón. Los resultados no mostraron cambios de la proteína UCP2 en hígado entre animales WT y KO, pero se observó una disminución en Gastrocnemio y un aumento en corazón de los niveles de UCP3 en los ratones KO de 12 meses de edad (Figura 4.21).

Para estudiar si existía una innervación simpática diferencial en los dos tipos de músculos, se decidió estudiar los niveles de receptores β_2 adrenérgicos. Así, observamos

una menor cantidad de receptores β_2 en el músculo esquelético de los animales KO de 12 meses (Figura 4.22) que se correlacionó con los menores niveles de UCP3 observados (Figura 4.21). Por otra parte, en el corazón se observó un aumento de la cantidad de receptores β_2 (Figura 4.22) que al igual que en el caso del músculo esquelético, también se correlacionaron con el aumento de UCP3 observado previamente (Figura 4.21).

A la vista de las diferencias observadas en los niveles de UCP3 en los distintos tipos de músculos y dado que es conocido que UCP3 tiene un papel importante en el proceso de β -oxidación de ácidos grasos en estos tejidos, se decidió estudiar el papel protector de esta proteína desacoplante frente a la dieta grasa. Con este fin, los animales fueron alimentados con una dieta grasa no obesogénica que contenía una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados durante 16 semanas. Tras este tiempo, se evaluó la señalización de insulina tanto en los distintos tipos de músculos como en hígado, iWAT y eWAT.

Los resultados mostraron una deficiencia en la señalización de la insulina en hígado, Gastrocnemio, iWAT y eWAT en animales KO ali-

mentados con dieta grasa, mientras que no se observaron cambios en la señalización de la insulina del corazón (Figura 4.23).

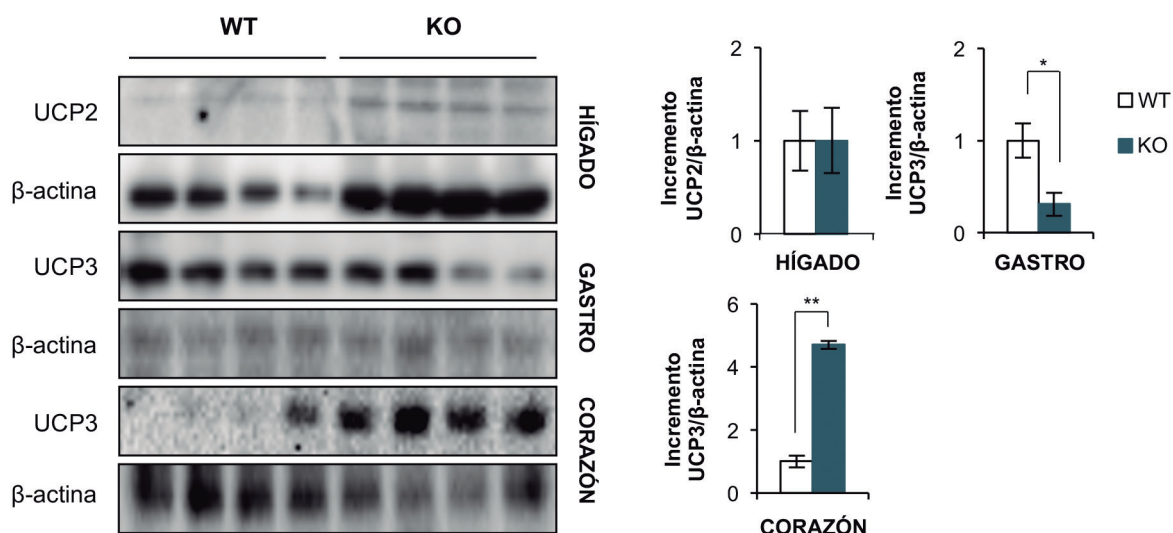


Figura 4.21. Blots representativos de la proteína UCP2 en hígado y de la proteína UCP3 de Gastrocnemio y corazón en ratones WT (n=4) y KO (n=4) de 12 meses de edad y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ entre grupos WT y KO.

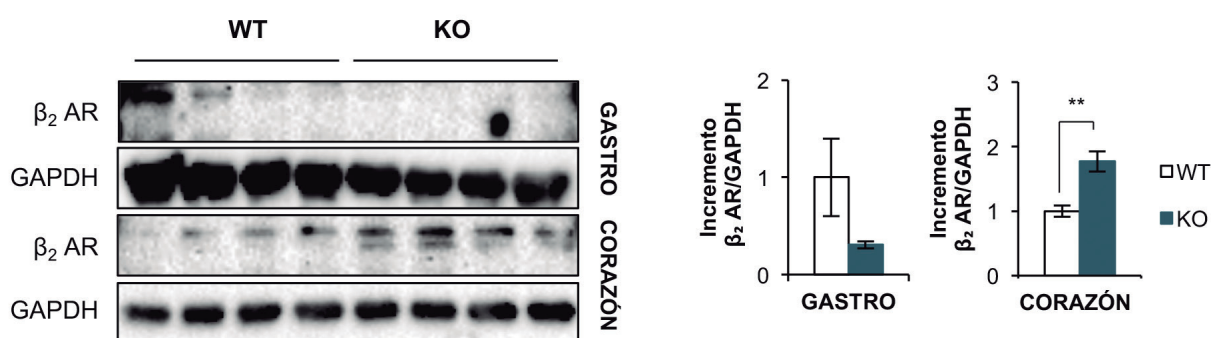


Figura 4.22. Blots representativos de los receptores β_2 adrenérgicos en Gastrocnemio y corazón de animales WT (n=4) y KO (n=4) de 12 meses de edad y su correspondiente cuantificación. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** $P < 0,01$ entre grupos WT y KO.

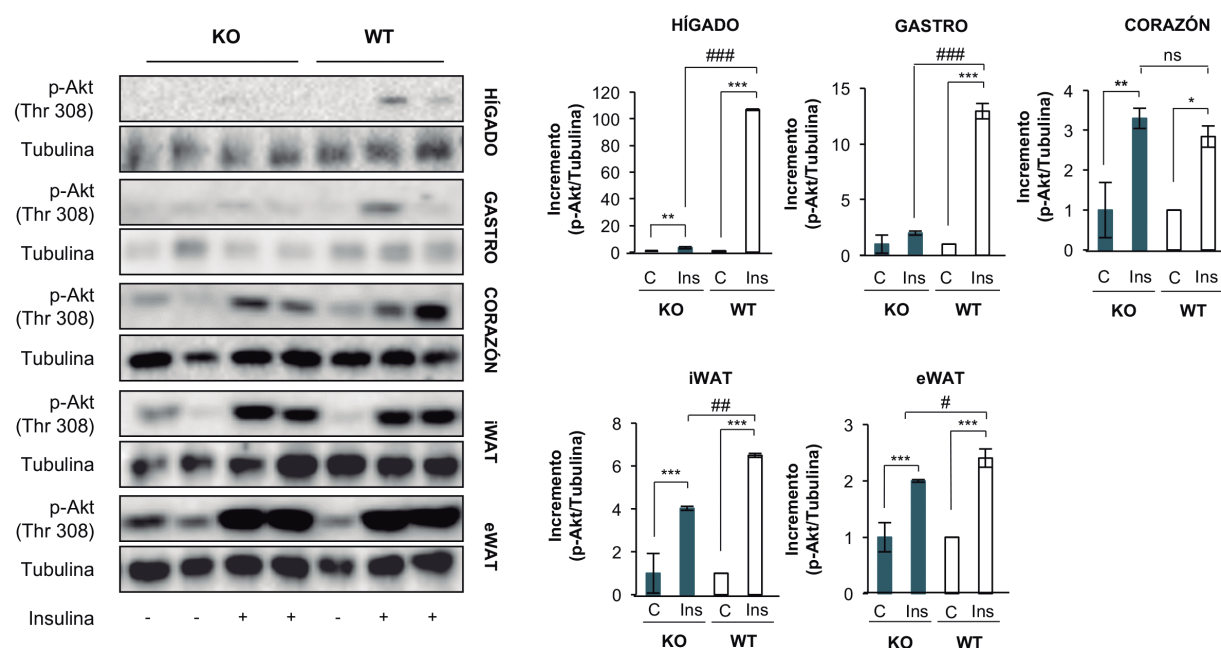


Figura 4.23 Blots representativos de las proteínas p-Akt (Thr308) y Akt en Hígado, Gastrocnemio, corazón, iWAT y eWAT de animales WT (n=3) y KO (n=4) alimentados durante 16 semanas con dieta grasa. Los resultados de la cuantificación del incremento de p-Akt/Akt se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre grupos control e insulina de animales WT y KO, # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ entre grupos de insulina de animales WT y KO.

4.2 EFECTOS DE LA DELECCIÓN DEL IR Y DEL IGF1R EN EL TEJIDO ADIPOSO MARRÓN: TERMOGÉNESIS, MARRONIZACIÓN, MECANISMOS DE CONTROL DE CALIDAD MITOCONDRIAL Y ESTATUS METABÓLICO.

4.2.1 Generación y caracterización del modelo BATIGFIRDKO.

Tras estudiar los efectos de la delección de IGF1R en el tejido adiposo marrón y con el fin de eliminar la posible señalización compensatoria llevada a cabo por el receptor de insulina, se planteó como uno de los objetivos de esta tesis generar un modelo IR/IGF1R doble *knockout* específico de tejido adiposo marrón. Para ello, se cruzaron ani-

males que presentaban el exón 3 del *Igf1r* y el exón 4 del *Irf* flanqueados por secuencias loxP con animales *Irf^{loxP/loxP} Igf1r^{loxP/loxP} Ucp1-Cre^{+/-}* (los cuales tienen la recombinasa Cre bajo la acción del promotor de Ucp1 específico de tejido adiposo marrón). El resultado de este cruce fue la generación del modelo BATIGFIRDKO.

En primer lugar, se corroboró por Western blot la ausencia del IGF1R o el IR en tejido adiposo marrón en animales *Irf^{loxP/loxP} Igf1r^{loxP/loxP}* (los cuales fueron utilizados siempre como controles o *wild-type*) y en ratones BATIGFIRDKO de 3 meses. Los resultados nos mostraron una ligera expresión de ambas proteínas probablemente debido a la infiltración de tejido adiposo blanco en el tejido remanente (Figura 4.24 A). A continuación, se

comprobó mediante PCR de ADNc obtenido de tejido adiposo marrón de ratones WT y DKO, si la delección del exón 3 del *Igf1r* y del exón 4 del *Ir* había tenido lugar. Así se observó que los animales WT presentaron una banda de 398pb para el *Igf1r* y una banda de 512pb para el *Ir*, mientras que los ratones DKO presentaron únicamente una banda de 85pb o una banda de 363 pb, cuando el exón 3 del *Igf1r* o el exón 4 del *Ir* fueron delecionados, respectivamente (Figura 4.24 B)

Por otra parte, se corroboró por *Western blot* la presencia del IGF1R y del IR en diferentes tejidos como hígado, Gastrocnemio, corazón e iWAT de ratones WT y DKO de 3 meses (Figura 4.25) lo cual demostró que la delección de ambos receptores fue específica del tejido adiposo marrón.

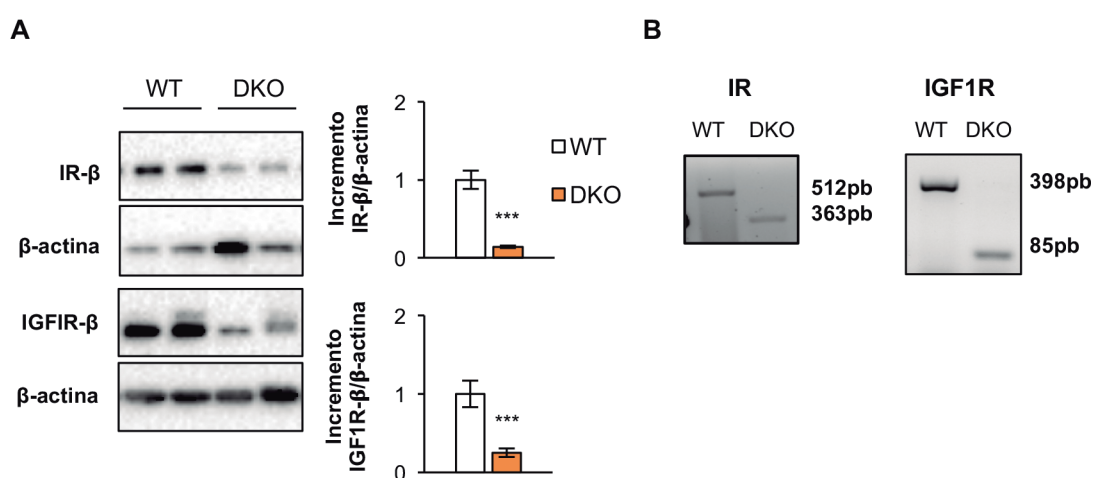


Figura 4.24. A: Imagen representativa de western blot de IGF1R e IR en tejido adiposo marrón en ratones WT (n=6) y DKO (n=6) de 3 meses. B: Resultado de la PCR que detecta la delección del exón 3 del *Igf1r* o la delección del exón 4 del *Ir* en ADNc extraído del tejido adiposo marrón. Los resultados fueron expresados como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** P<0,001 entre animales WT y DKO.

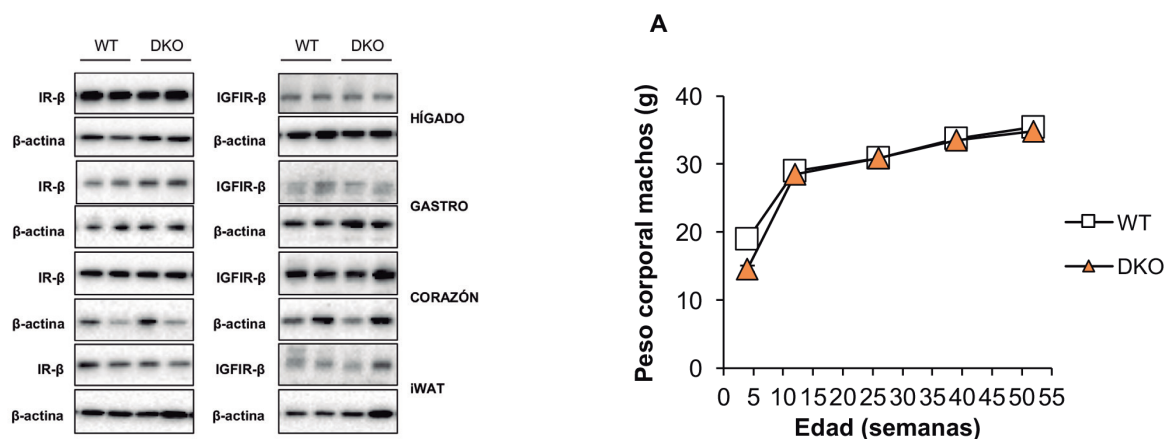


Figura 4.25. Blots representativos de las proteínas IGF1R e IR en Hígado, Gastrocnemio, corazón e iWAT de ratones WT (n=6) y DKO (n=6) de 3 meses de edad.

Figura 4.26. Gráfica que representa la evolución del peso corporal de ratones WT (n=58/52/24/14/23) y DKO (n=61/36/15/10/29) desde la semana 4 (destete) hasta la semana 52 de desarrollo.

Tras comprobar que la delección de ambos receptores solo tiene lugar en el BAT, el siguiente paso fue estudiar si la ausencia de estos receptores podría influir en el peso corporal de los ratones. Para ello se evaluó el peso de los ratones desde su destete a las 4 semanas hasta la semana 52 de desarrollo. Los resultados nos indicaron que no existen diferencias en el peso corporal entre animales WT y animales DKO a lo largo de su desarrollo ([Figura 4.26](#)).

4.2.2 Efectos de la delección del IGF1R y del IR sobre el desarrollo y función termogénica del BAT y sobre la marronización del tejido adiposo inguinal y epididimal.

A la vista de los resultados obtenidos por el grupo de C.R Kahn tras la generación de dos modelos animales IR/IGF1R DKO, donde la recombinasa Cre actuó bajo la acción del promotor $\alpha P2$ o bajo el promotor de adiponectina y con el fin de esclarecer la contribución del tejido adiposo marrón en los fenotipos observados, se decidió utilizar el modelo BATIGF1RDKO para estudiar el papel de ambos receptores sobre el desarrollo y la funcionalidad del BAT, así como el proceso de marronización del tejido adiposo blanco inguinal y epididimal.

En primer lugar, para estudiar si la delección de ambos receptores afectó al desarrollo del tejido, se observó su morfología macroscópica tras las disecciones y se cuantificó su peso en función del peso corporal del animal. Los resultados nos indicaron una severa atrofia del tejido adiposo marrón de aproximadamente un 80% en los ratones DKO de 3 meses ([Figura 4.27 A, paneles superiores y B](#)). Además de la atrofia, se observó una elevada infiltración por parte del tejido adiposo blanco circundante, lo cual en muchos casos hizo muy difícil su disección.

En segundo lugar, para comprobar la morfología de los adipocitos marrones y corroborar la infiltración grasa se realizó una tinción de hematoxilina y eosina en cortes de BAT de ratones WT y DKO de 3 meses células ([Figura 4.27 A, paneles inferiores](#)) y se cuantificó tanto el área como el número de adipocitos marrones. Los resultados nos mostraron una hipertrofia de los adipocitos marrones en ratones DKO de 3 meses acompañado de una disminución significativa del número de células ([Figura 4.27 C, D](#)). A continuación, con el fin de verificar si el aumento del tamaño de las gotas lipídicas observado en las tinciones de hematoxilina y eosina se debía a alteraciones en el metabolismo lipídico del tejido, se realizó un ensayo de Lipólisis *ex vivo*. Los resultados del ensayo nos indicaron que los animales DKO de 3 meses presentaban una menor Lipólisis ([Figura 4.27 E](#)) hecho que se correlacionó con el aumento del tamaño de las gotas lipídicas previamente observado.

Con el fin de estudiar la actividad metabólica del BAT, se analizó mediante ensayos de PET la captación de glucosa marcada radioactivamente tanto a temperatura ambiente como a 4 °C ([Figura 4.28 A](#)). Los resultados indicaron que mientras que los animales WT aumentaron la captación de glucosa en el BAT interescapular en respuesta al frío, los ratones DKO presentaron una menor captación de glucosa tanto a temperatura ambiente como en respuesta al frío ([Figura 4.28 B](#)).

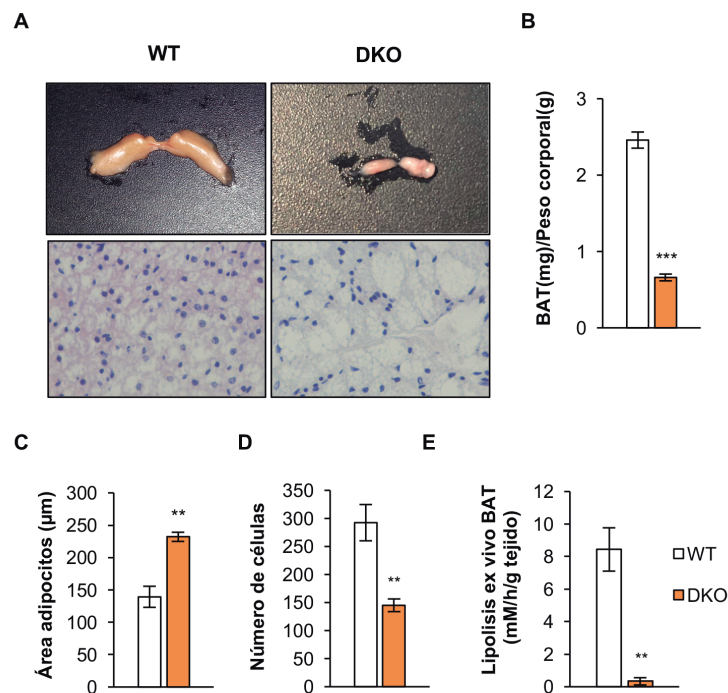


Figura 4.27. **A:** Imágenes representativas del tejido adiposo marrón (paneles superiores) y de las tinciones de hematoxilina y eosina (paneles inferiores) llevadas a cabo en ratones WT (n=3) y DKO (n=3) de 3 meses de edad. Las imágenes de las tinciones fueron tomadas con un objetivo 20X. **B:** Cuantificación del peso del BAT (mg) en relación al peso corporal (g) en animales WT (n=15) y DKO (n=19) de 3 meses. **C:** Cuantificación del área de los adipocitos marrones (μm²) de las imágenes de hematoxilina y eosina. Se cuantificaron 200 adipocitos por ratón. **D:** Cuantificación del número de adipocitos marrones. **E:** Análisis de Lipólisis ex vivo en BAT de ratones WT (n=5) y DKO (n=3) de 3 meses. Los resultados de las cuantificaciones fueron expresados como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** P<0,01 *** P<0,001 entre animales WT y DKO.

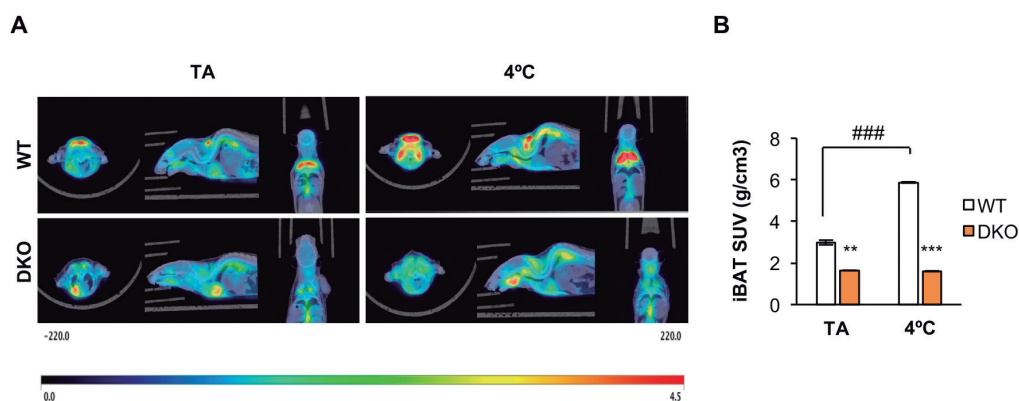


Figura 4.28. **A:** Imágenes de PET representativas de animales WT (n=2) y DKO (n=2) de 3 meses a temperatura ambiente o a 4°C. En dichas imágenes las zonas donde la captación de glucosa es mayor se observan en color rojo, mientras que las zonas donde no hubo captación aparecen de color verde o azul. **B:** Cuantificación de la captación de glucosa por parte del tejido interescapular representada como el valor de captación estándar (SUV). Los resultados de las cuantificaciones fueron expresados como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de dos vías seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** P<0,01; *** P<0,001 entre grupos WT y DKO a temperatura ambiente o a 4 °C, ### P<0,001 entre grupos WT.

Debido a la atrofia del BAT observada en los animales DKO, el siguiente paso fue estudiar si la función termogénica de estos animales podría estar alterada. Para ello, al igual que en el modelo animal anterior, los animales fueron mantenidos tres días a termoneutralidad (28 °C) y posteriormente se transfirieron a la cámara fría (4-6 °C) durante 12 horas. Durante este periodo se tomaron mediciones regulares de la temperatura corporal de los ratones mediante el uso de una sonda rectal. Los resultados indicaron que los animales DKO tanto de 3 como de 12 meses presentaban un fallo termogénico severo. En todos los experimentos, los animales DKO de 3 y 12 meses tuvieron que ser sacados de la cámara fría tras 4h de exposición al frío para evitar la hipotermia ya que alcanzaron temperaturas corporales por debajo de los 32 °C (Figura 4.29).

Tras observar que los animales DKO presentaban un defecto termogénico severo, nos preguntamos si la delección de ambos receptores podría afectar a la marronización de los tejidos adiposos inguinal y epididimal. Para ello se estudió la presencia de UCP1 mediante inmunohistoquímica en los tejidos adiposos inguinal y epididimal de animales WT y DKO de 3 meses. Los resultados indicaron una mayor marronización del tejido adiposo inguinal en los ratones DKO de 3 meses, además en el tejido adiposo epididimal también se encontraron algunos adipocitos *beige* aislados (Figura 4.30 A). Para corroborar el proceso de marronización observado, se decidió medir la cantidad de proteína UCP1 en ambos depósitos de tejido adiposo blanco mediante *Western blot*. Los resultados indicaron una tendencia a presentar mayores niveles de UCP1 tanto en el tejido adiposo inguinal como en el epididimal (Figura 4.30 B).

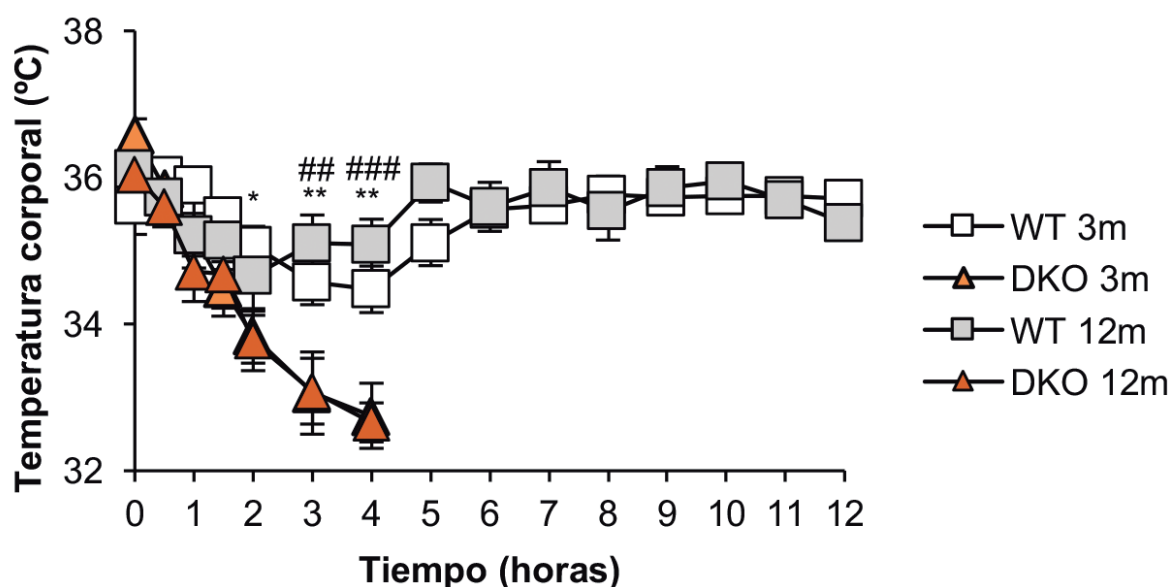


Figura 4.29. Gráfica donde se representan los resultados de los experimentos de exposición al frío en animales WT (n=8 de 3 meses, n=4 de 12 meses) y DKO (n=7 de 3 meses, n=4 de 12 meses) de 3 y 12 meses. La gráfica muestra la temperatura corporal de los animales durante las 12h de duración del experimento. Los resultados fueron expresados como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de dos vías seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05 ** P<0,01; entre grupos WT y DKO de 3 meses, ## P<0,01; ### P<0,001 entre grupos WT y DKO de 12 meses.

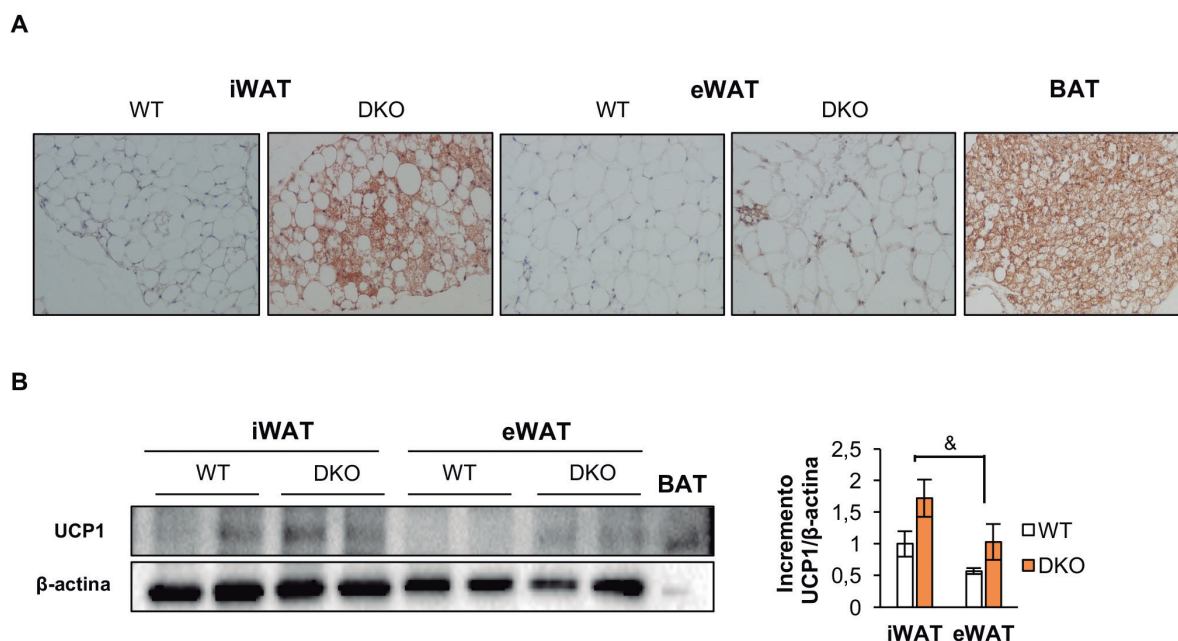


Figura 4.30. **A:** Inmunohistoquímica de Ucp1 en cortes de tejidos adiposos inguinal y epididimal en animales WT (n=3) y DKO (n=3) de 3 meses. En esta tinción se utilizó un corte de BAT como control positivo de la tinción. El proceso de marronización se visualiza como la presencia de pequeñas agrupaciones de células con una disposición de vacuolas lipídicas multilocular teñidas de color marrón. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo 20X. **B:** Blots representativos de la proteína UCP1 en el tejido adiposo inguinal y epididimal (45 μ g de carga) de animales WT y DKO de 3 meses (n=4 por grupo). En todos los casos 5 μ g de iBAT fueron usados como control positivo de los niveles de proteína UCP1. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas & P<0,05 entre grupos iWAT DKO y eWAT DKO.

4.2.3 Contribución del IGF1R y del IR sobre la mitocondriogénesis, dinámica mitocondrial y mitofagia.

Debido a las alteraciones observados en los ratones DKO tanto en la morfología y desarrollo del BAT como en su funcionalidad, nos planteamos estudiar si la morfología de las mitocondrias (orgánulo más abundante en el BAT) podría estar afectada. Así, observamos que los animales DKO presentaron un menor número de mitocondrias por célula y además estas presentaron un menor tamaño que las presentes en animales WT (Figura 4.31 B y C). Además, se observó una alteración de las crestas mitocondriales en los ratones DKO (Figura 4.31 A paneles inferiores).

A pesar de los daños observados en las mitocondrias de los animales DKO, no observamos en ninguno de los animales analizados la presencia de autofagosomas que estuvieran englobando a las mitocondrias dañadas. Ante este hecho, decidimos estudiar distintas proteínas implicadas en los procesos de autofagia y mitofagia por *Western blot*. Los resultados nos indicaron un defecto en las principales proteínas implicadas en el proceso mitofágico PINK-1 y PARKINA, así como una disminución de la proteína adaptadora p62 en el BAT de ratones DKO de 3 meses. Por otra parte, no se observaron diferencias en los niveles de la proteína LC3B-II (forma lipídica esencial en la formación y elongación del autofagosoma) (Figura 4.32).

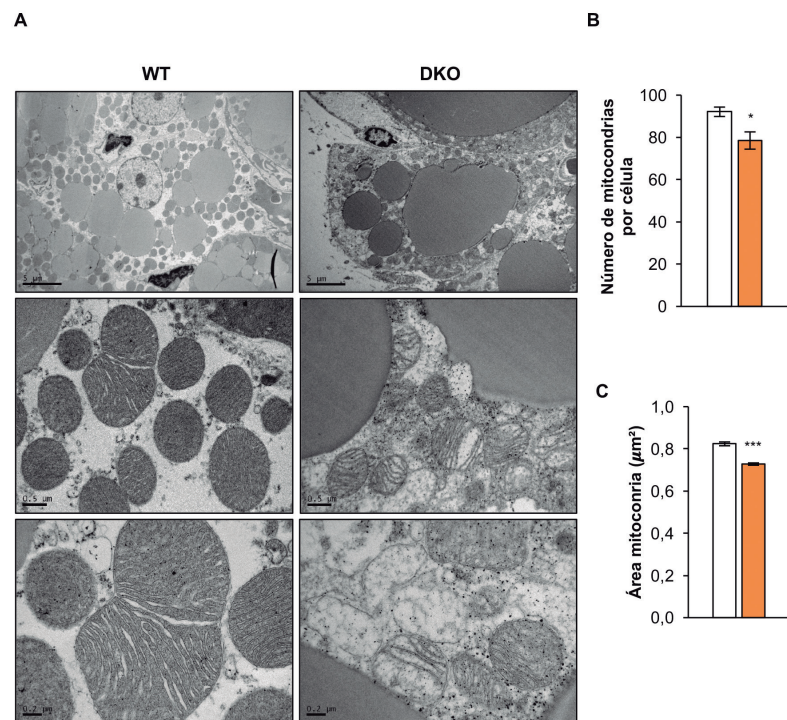


Figura 4.31. A: Imágenes representativas de microscopía electrónica de adipocitos marrones de ratones WT (n=3) y DKO (n=3) de 3 meses (paneles superiores, barra escala 5 μm) y detalle de las mitocondrias de ambas células (paneles intermedios e inferiores, barras de escala 0,5 μm y 0,2 μm respectivamente) B: Cuantificación del número de mitocondrias por adipocito marrón. Se cuantificaron las mitocondrias de 15 células por animal C: Cuantificación del área de las mitocondrias (μm^2). Se cuantificaron las mitocondrias de 15 células por animal. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05 *** P<0,001 entre animales WT y DKO.

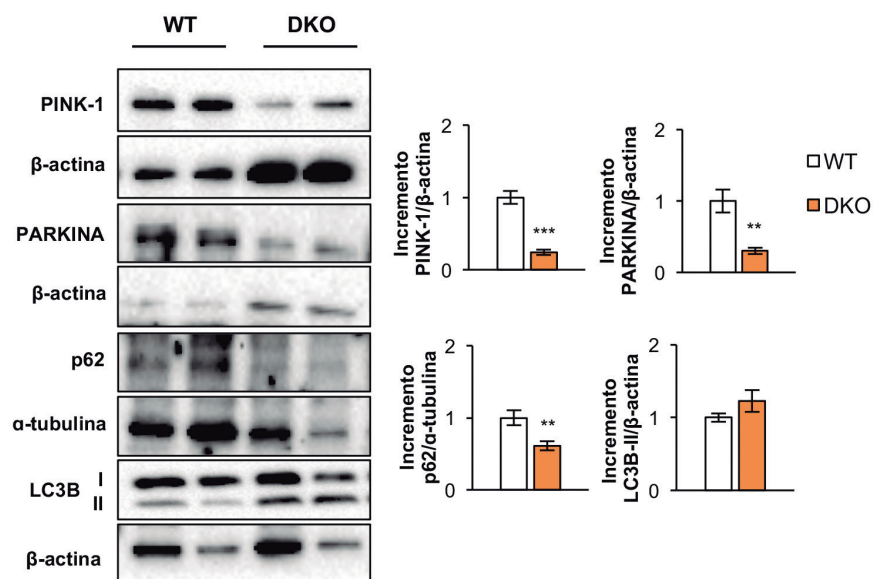


Figura 4.32. Blots representativos de las proteínas PINK-1, PARKINA, p62 y LC3B en ratones WT (n=6-7) y DKO (n=5-7) de 3 meses y su correspondiente cuantificación. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** P<0,01; *** P<0,001 entre animales WT y DKO.

Por otra parte, se estudiaron distintas proteínas implicadas en los procesos de dinámica mitocondrial esenciales para el mantenimiento de una población de mitocondrias integras. Se observó una disminución de la proteína de fusión MFN2, de la relación p-DRP1/DRP1 (la fosforilación de esta proteína es esencial para la iniciación de la fragmentación de las mitocondrias tras la activación del BAT por el frío) y de la proteína VDAC (usado como marcador de masa mitocondrial) en el BAT de ratones DKO de 3 meses. Además, se encontró una disminución de la proteína OPA-1 en el BAT de ratones DKO de 3 meses, que se asoció con la disrupción de las crestas mitocondriales previamente observada (Figura 4.33).

En último lugar, se analizaron distintas proteínas implicadas en la funcionalidad del BAT como HSL (responsable de la lipólisis que tiene lugar en el BAT) y UCP1 (principal proteína implicada en el proceso termogénico). Ambas proteínas se encontraron disminuidas en el BAT de ratones DKO de 3 meses de edad. Además, se corroboró mediante *Western blot* la disminución del contenido mitocondrial observado en el BAT de los ratones DKO de 3 meses por microscopia electrónica. Para ello se analizaron los niveles proteicos de VDAC y de PGC1- α (marcador de biogénesis mitocondrial). Por otra parte, se observó una reducción de una de las principales proteínas implicadas en el estrés de retículo endoplásmico, la proteína BIP, así como una disminución de la proteína antiapoptótica BCL2 en el BAT de ratones DKO de 3 meses (Figura 4.34).

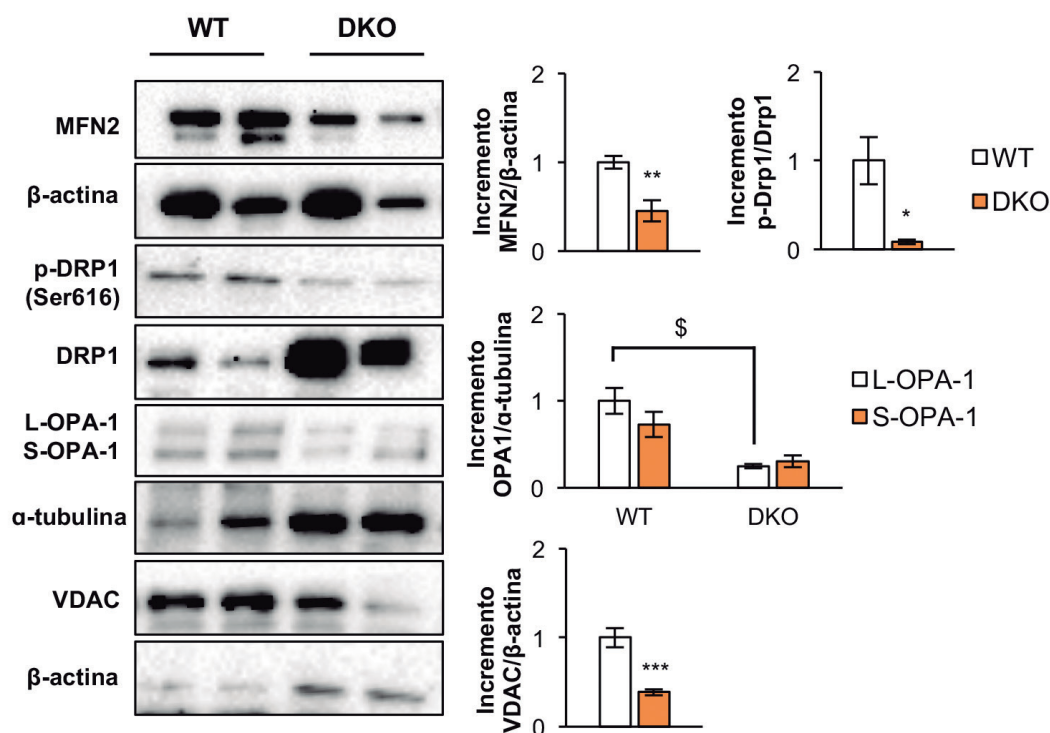


Figura 4.33. Blots representativos de las proteínas de fusión MFN2 y OPA-1, de la proteína de fisión DRP1 y su forma fosforilada, así como la proteína VDAC o PORINA en ratones WT ($n=4-8$) y DKO ($n=4-8$) de 3 meses y su correspondiente cuantificación. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ entre animales WT y DKO. En el caso de OPA-1 se realizó un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas \$ $P < 0,05$ entre grupos L-OPA-1 WT y L-OPA-1 DKO.

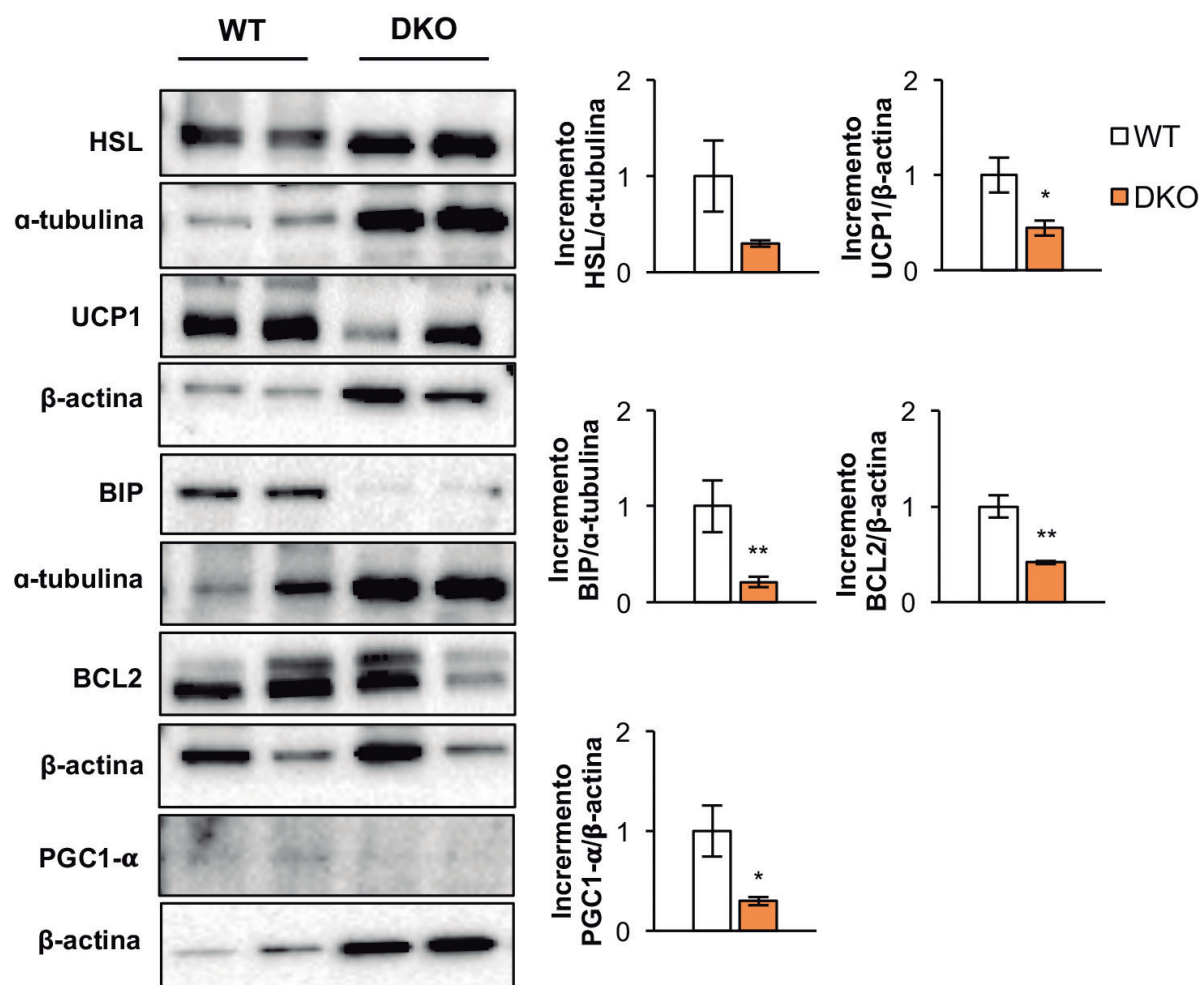


Figura 4.34. Blots representativos de las proteínas HSL, UCP1, BIP, BCL2 y PGC1-α en ratones WT (n=4-8) y DKO (n=3-7) de 3 meses y su correspondiente cuantificación. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05; ** P<0,01 entre animales WT y DKO.

De manera paralela al análisis de las distintas proteínas anteriormente descritas, se decidió estudiar los niveles de ARNm de distintos genes del BAT de los ratones WT y DKO de 3 meses: *Pgc1a* y *Tfam* (factores de transcripción implicados en la biogénesis mitocondrial), *Adrb3* (receptor β_3 adrenérgico), *Dio2* (desyodasa necesaria para la formación de hormona tiroidea T3) y *Ucp1*. Los ratones DKO de 3 meses presentaron unos mayores

niveles de *Adrb3*, *Dio2* y *Pgc1a*, así como una disminución de los niveles de *Tfam* (Figura 4.35). Las diferencias observadas entre los niveles proteicos de PGC1-α (Figura 4.34) y los niveles de ARNm nos sugirieron un posible defecto en la síntesis proteica debida a la falta de señalización de insulina en los animales DKO.

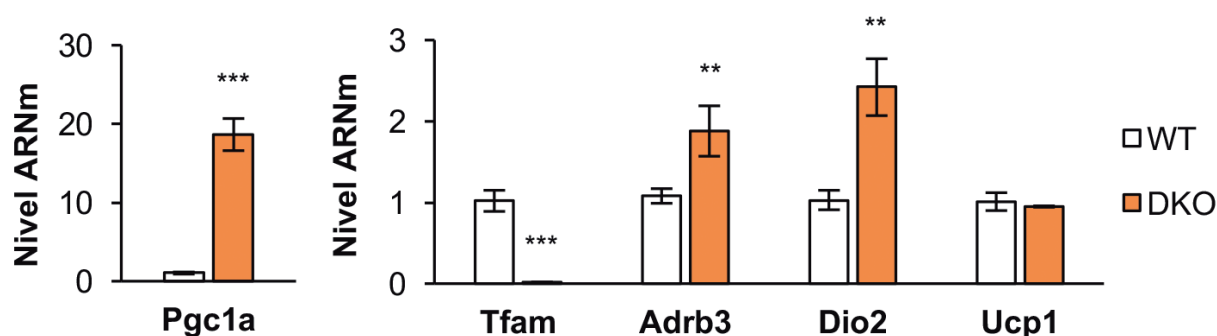


Figura 4.35. Niveles de ARNm de los genes *Pgc1a*, *Tfam*, *Adrb3*, *Dio2* y *Ucp1* en ratones WT (n=6-9) y DKO (n=3) de 3 meses. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ entre animales WT y DKO.

Debido a los cambios observados en las distintas proteínas involucradas en los procesos de dinámica mitocondrial, mitocondriogénesis y funcionalidad del BAT. Se decidió estudiar los niveles de algunas de estas proteínas en respuesta al frío. Para ello animales WT y DKO de 12 meses de edad fueron expuestos a condiciones de termoneutralidad o a 4 h a 4 °C. Posteriormente, dichos animales fueron sacrificados y se analizó los niveles de diferentes proteínas en el BAT mediante *Western blot*. Los resultados nos indicaron que los animales DKO presentaron niveles menores del cociente de los niveles proteicos de p-DRP1/DRP1, tanto en condiciones de termoneutralidad como en respuesta al frío en comparación con los ratones WT. Además, mientras que los animales WT fueron capaces de aumentar los niveles de S-OPA-1 en respuesta al frío, los animales DKO presentaron menores niveles de OPA-1 independientemente de las condiciones en las que se encontraron los animales.

En relación a la proteína PGC1- α , se corroboró que los animales DKO presentan menores niveles de esta proteína y que además estos animales fueron incapaces de inducir su expresión tras 4 horas de frío. Algo similar ocurrió con la proteína UCP1 donde solo se observó que existen menores niveles de proteína en los animales DKO, pero que al igual que en el caso de PGC1- α , estos animales no fueron capaces de inducir esta proteína en respuesta al frío. Por último, se quiso estudiar un posible efecto compensatorio de la proteína BMP7 en respuesta al frío. Así, se observó que mientras que los animales WT fueron capaces de inducir un gran aumento de BMP7 en respuesta al frío, en el caso de los animales DKO este aumento fue mucho menor no alcanzando la significatividad estadística. Además, también se observó que en cualquiera de las condiciones los animales DKO siempre presentaron unos menores niveles de esta proteína (Figura 4.36).

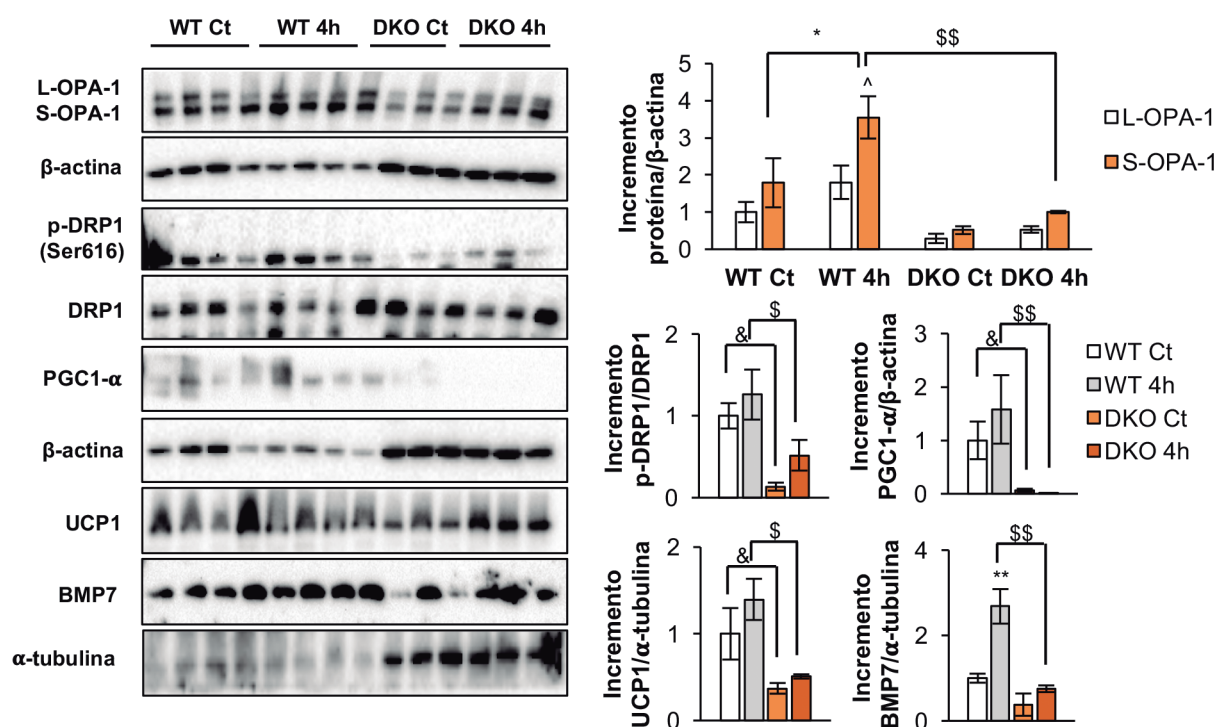


Figura 4.36. Blots representativos de las proteínas OPA-1, p-DRP1, DRP1, PGC1-α, UCP1 y BMP7 en animales WT (n=4 por grupo) y DKO (n=3 por grupo) de 12 meses en condiciones de termoneutralidad o en respuesta al frío y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía o de dos vías en el caso de OPA-1 seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas ** P<0,01 entre grupos WT Ct y WT 4h; & P<0,05 entre grupos WT Ct y DKO Ct, \$ P<0,05; \$\$ P<0,01 entre grupos WT 4h y DKO 4h. ^ P<0,05 between L-OPA-1 WT 4h and S-OPA-1 WT 4h.

A la vista de las diferencias observadas en las distintas proteínas analizadas en condiciones de termoneutralidad o en respuesta al frío, de manera paralela se decidió estudiar los niveles de ARNm de distintos genes del BAT de ratones WT y DKO de 12 meses en respuesta al frío. Así se estudiaron *Pgc1a*, *Tfam*, *Fgf21* (factor secretado por el BAT en respuesta al frío que está implicado en la inducción del proceso de marronización entre otras funciones), *Adrb3*, *Dio2* y *Ucp1*. En relación a *Pgc1a*, se observó un incremento en respuesta al frío tanto en animales WT como DKO, siendo este aumento mucho mayor en animales DKO (Figura 4.37). En rela-

ción a *Fgf21*, se observó un gran aumento de los niveles de ARNm en animales DKO tras la exposición al frío. También se observó unos mayores niveles de *Adrb3* en animales DKO como ya habíamos observado previamente (Figura 4.35) y además dichos niveles disminuyeron en respuesta al frío tanto en animales WT como en DKO. Los niveles de *Dio2* aumentaron en respuesta al frío tanto en ratones WT como DKO. Por último, se observó un aumento de los niveles de *Ucp1* en respuesta al frío tanto en animales WT como DKO, siendo esta menor en los animales DKO (Figura 4.37).

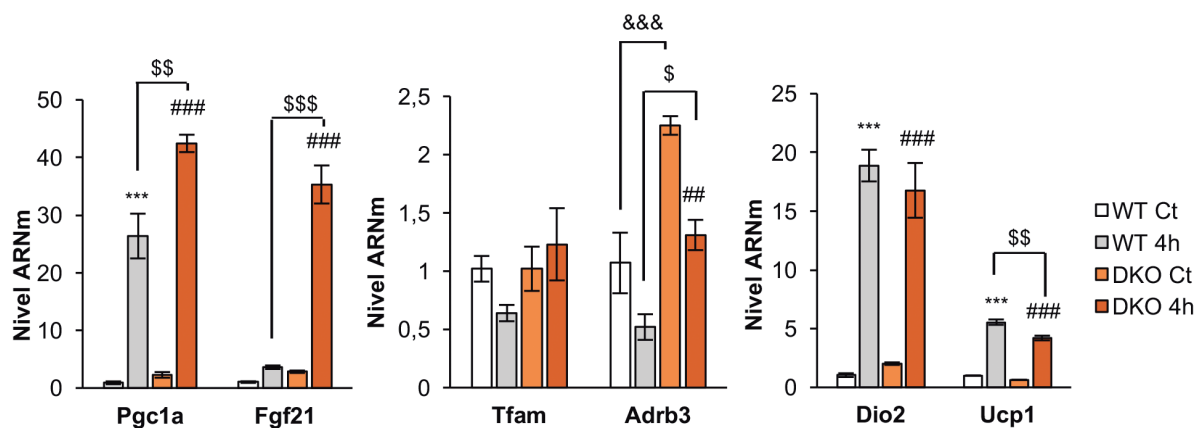


Figura 4.37. Niveles de ARNm de los genes *Pgc1a*, *Fgf21*, *Tfam*, *Adrb3*, *Dio2* y *Ucp1* en ratones WT (n=6-9) y DKO (n=3) de 12 meses en condiciones de termoneutralidad o en respuesta al frío. Los resultados se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** $P < 0,001$ entre grupos WT Ct y WT 4h; ## $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ entre grupos DKO Ct y DKO 4h; &&& $P < 0,001$ entre grupos WT Ct y DKO Ct; \$ $P < 0,05$; \$\$ $P < 0,01$; \$\$\$ $P < 0,001$ entre grupos WT 4h y DKO 4h.

Con el fin de comprobar si las diferencias observadas en los niveles proteicos de BMP7 y en los niveles de ARNm de *Dio2* en el BAT en respuesta al frío se correlacionaban con alteraciones en los niveles plasmáticos de BMP7 y T3, se evaluaron mediante ELISA los niveles de ambos factores en el plasma de animales WT y DKO de 12 meses alimentados sometidos a condiciones de termoneutralidad o en respuesta al frío. Los resultados nos indicaron que, aunque no se observó un aumento significativo de la proteína BMP7 en el BAT de los animales DKO en respuesta al frío, si aumentaron los niveles plasmáticos de este factor en dichas condiciones (Figura 4.38 A). Este hecho nos sugirió que en respuesta al frío el BAT no fue la principal fuente productora de BMP7, si no que probablemente la producción de este factor fue llevada a cabo por otros tejidos como el riñón. En el caso de T3, en los ratones WT los mayores niveles de

Dio2 en respuesta al frío (Figura 4.37) se correlacionaron con mayores niveles de T3 (Figura 4.38 B). Además, los mayores niveles de *Dio2* observados en el BAT de ratones DKO en condiciones de termoneutralidad (Figura 4.37) también se correlacionaron con mayores niveles de T3 (Figura 4.38 B). Sin embargo, en respuesta al frío, aun observándose un aumento significativo de *Dio2* en el BAT de ratones DKO (Figura 4.37), en estas condiciones la enzima *Dio2* del BAT no fue la responsable de la producción de T3 en plasma ya que sus niveles no se vieron alterados (Figura 4.38 B).

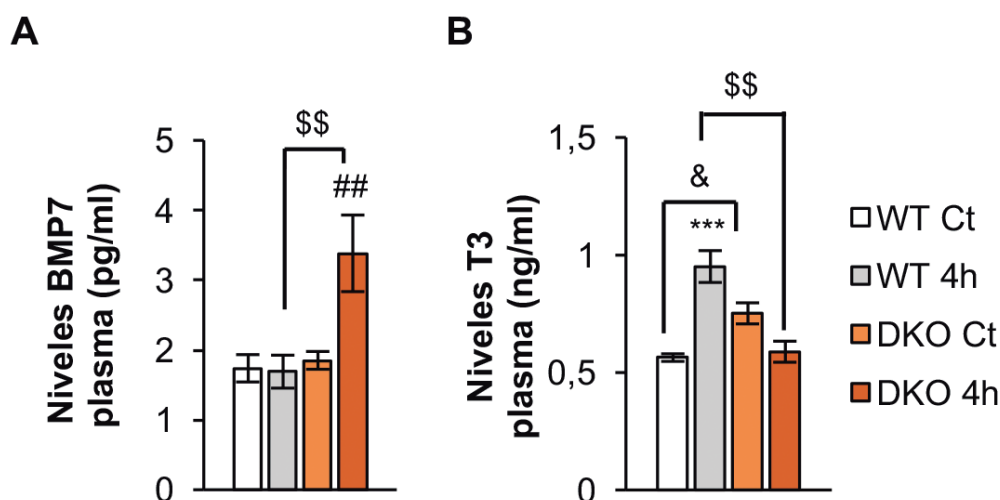


Figura 4.38. **A:** Niveles plasmáticos de BMP7 en ratones WT (n=8 por grupo) y DKO (n=4 por grupo) de 12 meses en condiciones de termoneutralidad o en respuesta al frío. **B:** Niveles plasmáticos de T3 en ratones WT (n=9 Ct, n=4 4h) y DKO (n=6 Ct, n=4 4h) de 12 meses en condiciones de termoneutralidad o en respuesta al frío. Los resultados se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** $P<0,001$ entre grupos WT Ct y WT 4h; ## $P<0,01$ entre grupos DKO Ct y DKO 4h; & $P<0,05$ entre grupos WT Ct y DKO Ct; \$\$ $P<0,01$ entre grupos WT 4h y DKO 4h.

4.2.4 Función del IGF1R y del IR en la redistribución del órgano adiposo, homeostasis glucídica y estatus endocrino.

Para comprobar si la afectación de la función termogénica observada en los animales DKO podría ocasionar alteraciones en el órgano adiposo, en primer lugar, se decidió valorar mediante RMN la cantidad de grasa de los animales WT y DKO de 3 meses de edad. Los resultados mostraron un aumento del volumen de grasa en los ratones DKO de 3 meses (Figura 4.39 A, B). En segundo lugar, para comprobar si esta grasa se distribuía de manera diferencial entre compartimentos subcutáneos y viscerales, se cuantificó el peso de distintos compartimentos: inguinal, epididimal, retroperitoneal y mesentérico. Los resultados mostraron un aumento del peso en todos los compartimentos grasos de los

animales DKO de 3 meses excepto en el iWAT donde se observó una ligera disminución (Figura 4.39 C).

A continuación, con el fin de estudiar la morfología y el número de adipocitos se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina en cortes de los distintos compartimentos grasos (Figura 4.40 A). Los resultados indicaron un mayor tamaño y un menor número de los adipocitos del iWAT y eWAT de los ratones DKO de 3 meses (Figura 4.40 B, C).

En relación a la homeostasis glucídica, se realizaron test de tolerancia a la glucosa y a la insulina en animales WT y DKO de 3 y 12 meses y se evaluaron los niveles de insulina plasmáticos mediante ELISA. Los animales DKO tanto de 3 como de 12 meses presentaron resistencia a la insulina la cual fue acompañada de una moderada hiperinsulinemia, mientras que la tolerancia a la glucosa no se vio afectada en ninguno de los casos (Figura 4.41 A, B).

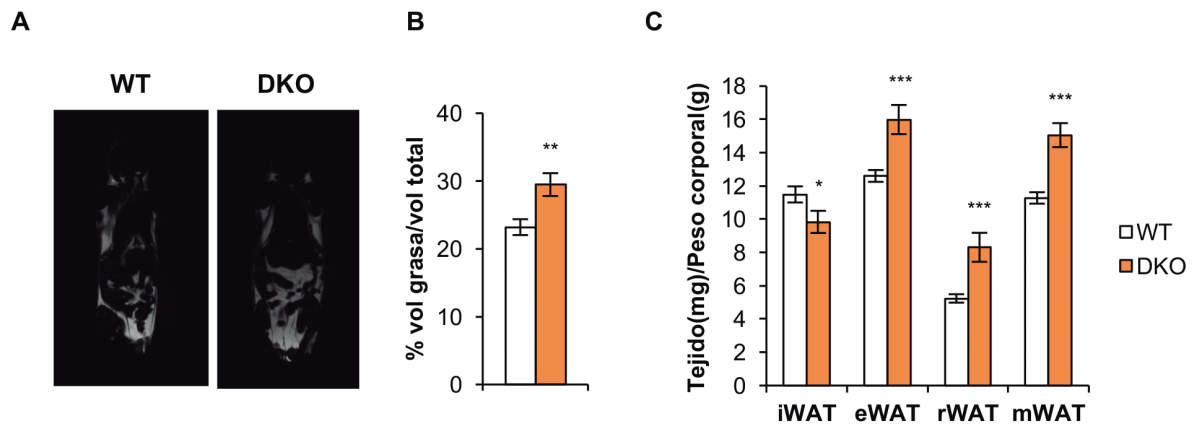


Figura 4.39. **A:** Imágenes de RMN representativas de animales WT y DKO de 3 meses **B:** Cuantificación de las imágenes de RMN de animales WT (n=15) y DKO (n=9) de 3 meses. **C:** Cuantificación del peso de los tejidos iWAT, eWAT, rWAT y mWAT en función del peso corporal en animales WT (n=18) y DKO (n=15) de 3 meses. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre animales WT y DKO.

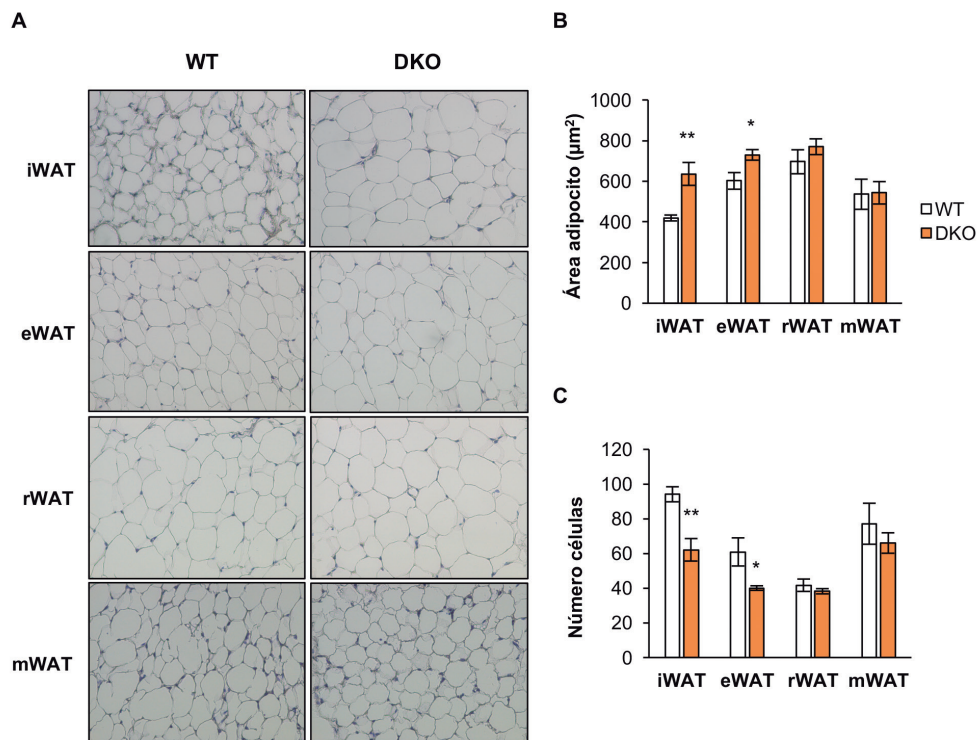
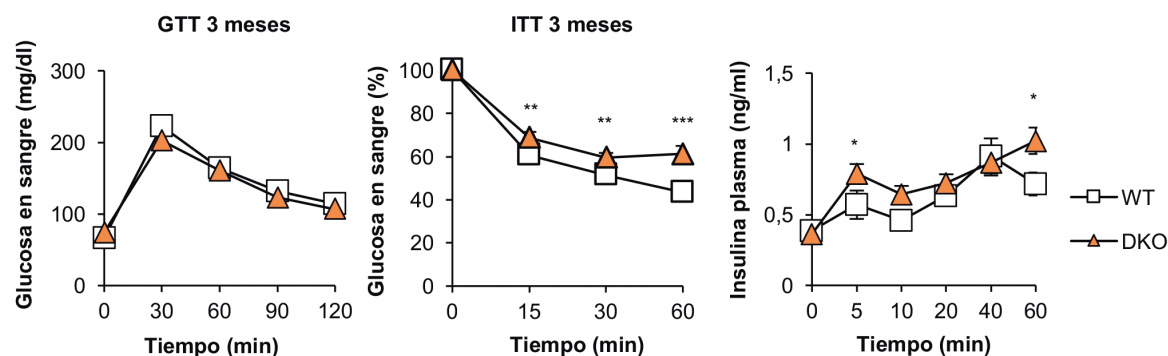


Figura 4.40. **A:** Imágenes de tinciones con hematoxilina y eosina de cortes de iWAT, eWAT, rWAT y mWAT de ratones WT (n=3) y DKO (n=3) de 3 meses tomadas con un objetivo 20X. **B:** Cuantificación del área de los adipocitos blancos medidos en μm^2 . Se cuantificaron 200 adipocitos por ratón. **C:** Cuantificación del número de adipocitos blancos. Los resultados de las cuantificaciones se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$ entre animales WT y DKO.

A



B

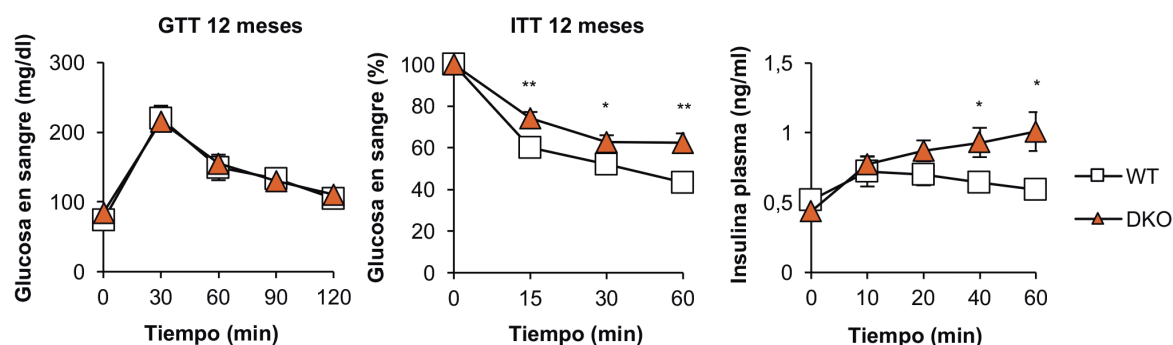


Figura 4.41. A: Test de tolerancia a la glucosa (GTT), test de tolerancia a la insulina (ITT) y niveles de insulina en plasma en animales WT (n=22 GTT, n=23 ITT, n=7 niveles insulina) y DKO (n=13 GTT, n= 19 ITT, n=8 niveles insulina) de 3 meses. B: Test de tolerancia a la glucosa (GTT), test de tolerancia a la insulina (ITT) y niveles de insulina en plasma en animales WT (n=9 GTT, n= 10 ITT, n=4-7 niveles insulina) y DKO (n=15 GTT, n=18 ITT, n=5-9 niveles insulina) de 12 meses. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre grupos WT y DKO de 3 o 12 meses.

Tras observar resistencia a la insulina en los animales DKO, el siguiente paso fue analizar la señalización de insulina en distintos tejidos de ratones WT y DKO de 3 meses. Para ello se inyectó 1U/Kg de insulina o solución salina a animales alimentados y tras 15 min se procedió a la extracción de los distintos tejidos. Los resultados indicaron una tendencia a la resistencia a la insulina que no al-

canzó la significatividad estadística en hígado y corazón (Figura 4.42) así como en rWAT (Figura 4.43) mientras que no se observaron diferencias en el resto de tejidos: Gastrocnemio, iWAT, eWAT y mWAT (Figura 4.42 y 4.43).

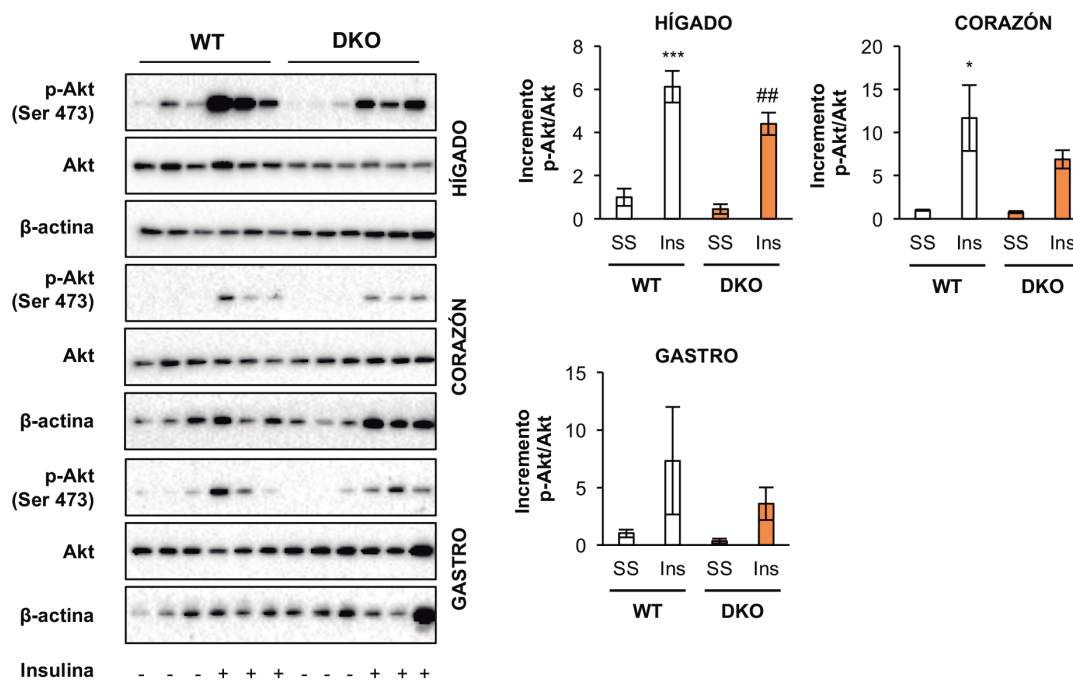


Figura 4.42. Blots representativos de las proteínas p-Akt (Ser 473) y Akt en hígado, corazón y Gastrocnemio de animales WT (n=3 SS, n=3 Ins) y DKO (n=3 SS, n=3 Ins) de 3 meses. Los resultados de la cuantificación del incremento de p-Akt/Akt se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05; *** P<0,001 entre grupos solución salina e insulina de animales WT, ## P<0,01 entre grupos solución salina e insulina de DKO.

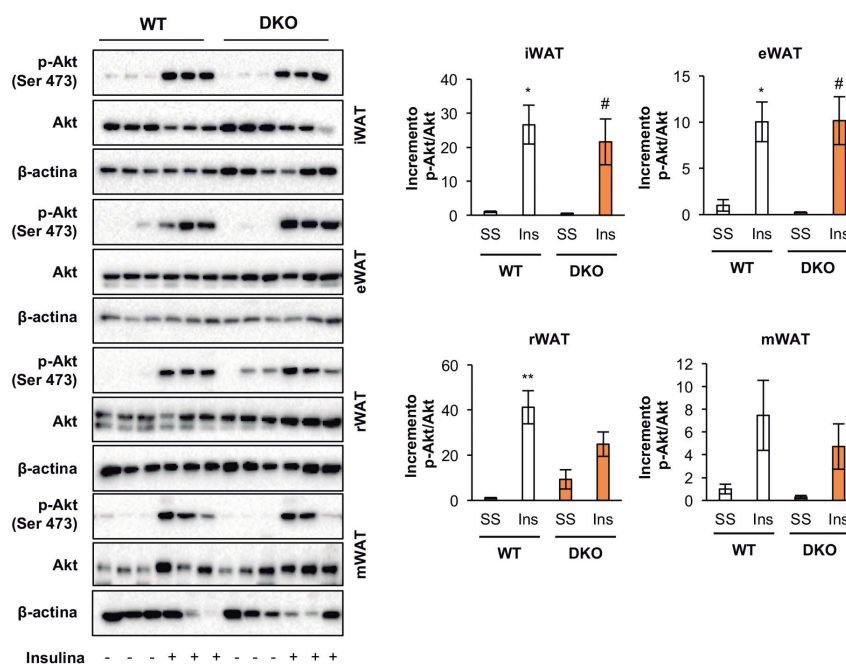


Figura 4.43. Blots representativos de las proteínas p-Akt (Ser 473) y Akt en iWAT, eWAT, rWAT y mWAT de animales WT (n=3 SS, n=3 Ins) y DKO (n=3 SS, n=3 Ins) de 3 meses. Los resultados de la cuantificación del incremento de p-Akt/Akt se expresan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05; *** P<0,001 entre grupos solución salina e insulina de animales WT, # P<0,05 entre grupos solución salina e insulina de DKO.

Basándonos en la severa deficiencia termogénica observada en los ratones DKO, quisimos comprobar si tras suministrar un exceso de energía mediante el uso de una dieta rica en grasas saturadas (HFD) durante 8 semanas, este hecho podría afectar a la redistribución del órgano adiposo, a los mecanismos de fisión mitocondrial y al estatus metabólico.

En relación al órgano adiposo observamos que, tras suministrar una dieta rica en grasas durante 8 semanas tras el destete de los animales, se observó un aumento gradual del peso corporal en los animales DKO en comparación con los animales WT (Figura 4.44 A). Además, este aumento de peso fue independiente de la ingesta ya que ambos grupos de animales ingirieron aproximadamente la misma cantidad de alimento por día (Figura 4.44 B).

Para corroborar que el aumento de peso observado en los animales DKO se debía a un aumento de la masa grasa, se analizó mediante RMN el porcentaje del volumen de grasa corporal de estos animales en relación al volumen corporal total. Los resultados obtenidos indicaron un aumento del volumen de grasa de un 20 % en ratones DKO tras 8 semanas de dieta HFD (Figura 4.45 A). El siguiente paso, fue evaluar si esta grasa se distribuía de manera diferencial entre los distintos compartimentos grasos tanto viscerales como subcutáneos y el BAT. Tras evaluar el peso de los distintos compartimentos en función del peso corporal, se observó un aumento de peso en los compartimentos epididimal, retroperitoneal y mesentérico en los ratones DKO tras 8 semanas de dieta grasa. Por otra parte, se observó una disminución de peso en el compartimento inguinal y el peso del BAT se redujo un 90 % acompañado de un aumento de la infiltración de grasa blanca en los ratones DKO (Figura 4.45 B).

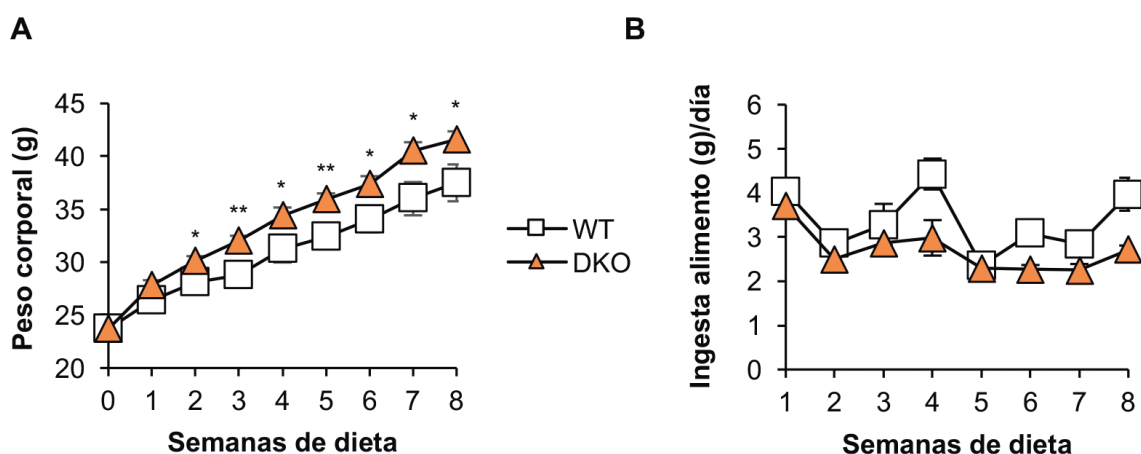


Figura 4.44. **A:** Gráfica que representa la evolución del peso corporal de ratones WT ($n=8$) y DKO ($n=13$) durante las 8 semanas de dieta grasa. **B:** Ingesta diaria de alimento por ratón durante las 8 semanas de dieta grasa ($n=3$ WT y $n=3$ DKO). Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$ entre grupos WT y DKO.

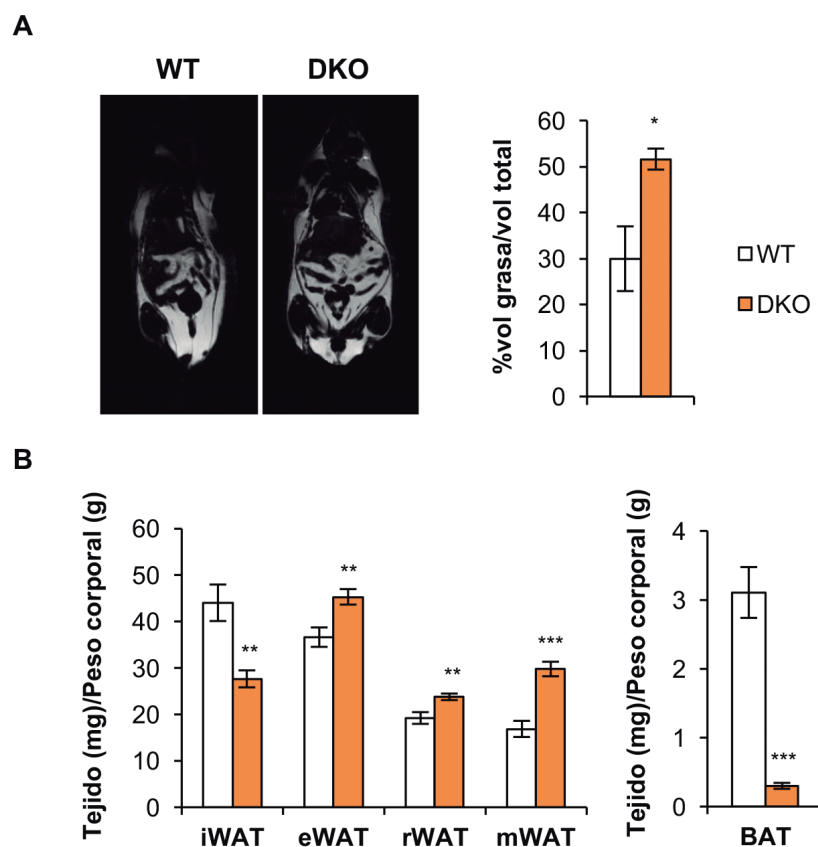


Figura 4.45. A: Imágenes de RMN representativas de animales WT (n=2) y DKO (n=3) tras 8 semanas de dieta grasa y su correspondiente cuantificación B: Cuantificación del peso de los tejidos iWAT, eWAT, rWAT, mWAT y BAT en función del peso corporal en animales WT (n=6) y DKO (n=8) tras 8 semanas de dieta grasa. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ entre animales WT y DKO.

También comprobamos la contribución del proceso de fisión mitocondrial a la termogénesis marrón tras la dieta grasa. Para ello analizamos las proteínas de fisión p-DRP1 y DRP1, la proteína de fusión OPA-1 y la proteína VDAC para analizar la masa mitocondrial. Los resultados indicaron una ligera disminución del cociente p-DRP1/DRP1 en ratones DKO tras 8 semanas de dieta grasa, que resulta del aumento de los niveles totales de DRP1 y la disminución de su fosforilación. A su vez, se observó una disminución de la proteína VDAC que podría indicar una disminución de la masa mitocondrial en los animales DKO sometidos a dieta grasa. Tam-

bién se observaron unos niveles menores de la proteína OPA-1 en los ratones DKO, observándose una mayor proporción de la isoforma S-OPA-1 (Figura 4.46).

En relación al estatus metabólico, se observó una resistencia a la insulina en los animales DKO sometidos a dieta grasa, la cual fue acompañada de una hiperinsulinemia severa (Figura 4.47), sin cambios en la glucemia en estado de alimentación. Además, se observó una hipertrigliceridemia en los ratones DKO sometidos a dieta grasa (Tabla 4.2).

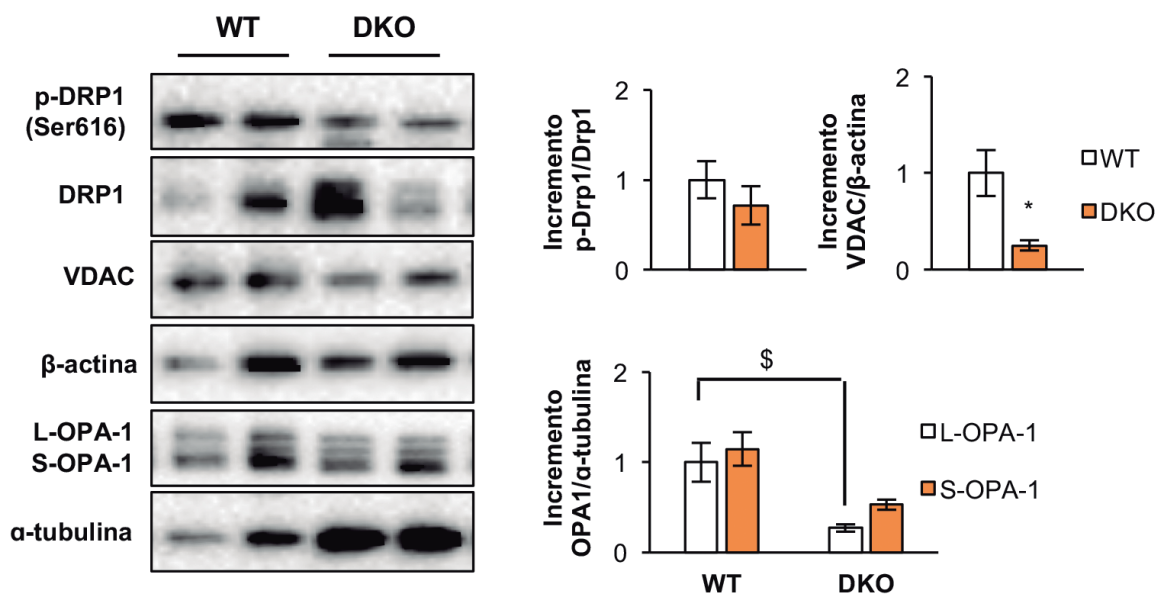


Figura 4.46. A: Blots representativos de las proteínas p-DRP1, DRP1, VDAC y OPA-1 en ratones WT y DKO tras 8 semanas de dieta y su correspondiente cuantificación. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$ entre animales WT y DKO. En el caso de OPA-1 se aplicó un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas \$ $P < 0,05$ entre grupos L-OPA-1 WT y L-OPA-1 DKO.

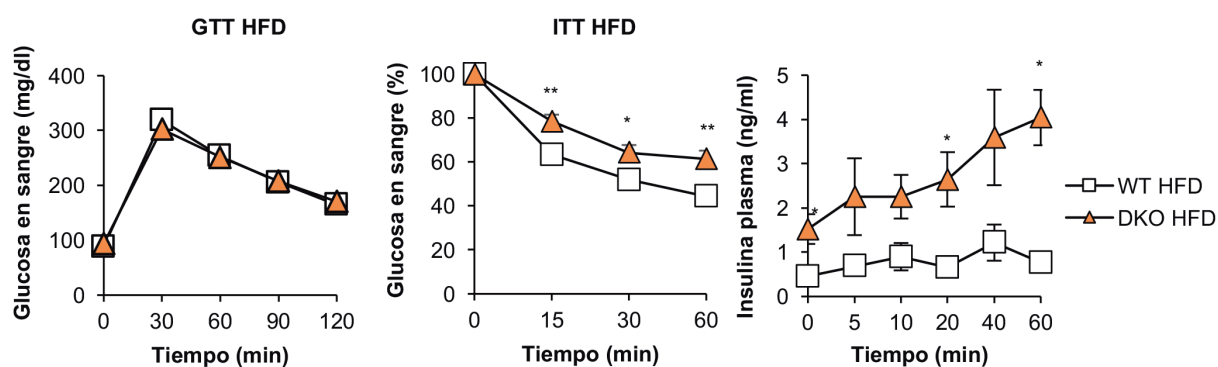


Figura 4.47. Test de tolerancia a la glucosa (GTT), test de tolerancia a la insulina (ITT) y niveles de insulina en plasma de animales WT ($n=8$ GTT, $n=9$ ITT, $n=6$ niveles insulina) y DKO ($n=11$ GTT, $n=12$ ITT, $n=5$ niveles insulina) tras 8 semanas de dieta grasa. Los resultados de la cuantificación se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ entre animales WT y DKO.

	WT	DKO	WT HFD	DKO HFD
T3 (ng/ml)	0,62±0,01 (n=11)	0,68±0,02 (n=8)	0,55±0,01 (n=4)	0,47±0,03 ⁱ (n=6)
IGF-1 (ng/ml)	133,42±10,47 (n=11)	272,75±18,79 ^a (n=6)	251,75±24,92 (n=4)	356,62±48,48 ^{c, h} (n=3)
BMP7 (pg/ml)	1,32±0,10 (n=13)	1,49±0,09 (n=12)	2,17±0,28 (n=7)	2,08±0,23 ^g (n=4)
Insulina (ng/ml)	0,69±0,05 (n=10)	0,78±0,12 (n=9)	0,53±0,19 (n=4)	4,77±1,52 ^{c, i} (n=4)
Glucosa (mg/dl)	145,47±4,28 (n=19)	149,21±4,81 (n=19)	149,66±7,29 (n=6)	141±4,38 (n=10)
TG (mg/dl)	30,58±2,79 (n=7)	80,75±7,94 ^c (n=6)	41,26±4,35 (n=5)	88,94±8,16 ^c (n=4)
Colesterol (mg/dl)	104,31±9,83 (n=8)	102,80±5,58 (n=8)	141,84±14,45 (n=8)	135,06±8,23 (n=6)
Leptina (ng/ml)	3,17±0,43 (n=8)	4,35±0,58 (n=8)	25,97±1,59 ^f (n=9)	27,52±3,46 ⁱ (n=9)
Adiponectina (ng/ml)	17,29±0,37 (n=12)	16,83±0,33 (n=12)	33,01±1,30 ^f (n=8)	31,37±1,09 ⁱ (n=8)
TNF-α (pg/ml)	4,26±0,38 (n=11)	4,10±0,34 (n=10)	3,57±0,39 (n=4)	3,97±0,31 (n=5)

Tabla 4.2. Estatus metabólico y endocrino en animales WT y DKO alimentados con dieta estándar o dieta grasa durante 8 semanas. Los resultados se representan como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del posttest Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas: ^a P<0,05; ^b P<0,01; ^c P<0,001 entre grupos WT y DKO o entre grupos WT HFD y DKO HFD. ^d P<0,05; ^e P<0,01; ^f P<0,001 entre grupos WT y WT HFD. ^g P<0,05; ^h P<0,01; ⁱ P<0,001 entre grupos DKO y DKO HFD.

Con el fin de estudiar si la ausencia de los receptores podría afectar al estatus metabólico de los animales WT y DKO, se analizaron mediante ELISA o ensayos colorimétricos los niveles plasmáticos de T3, IGF1, BMP7, insulina, glucosa, TG, colesterol, leptina, adiponectina y TNF-α en animales alimentados con dieta estándar o con dieta rica en grasas durante 8 semanas.

En relación a los niveles de T3 se observó una disminución en los ratones DKO HFD en comparación con ratones DKO. Los niveles de IGF1 fueron mayores tanto en ratones DKO como en ratones DKO HFD en compa-

ración con sus controles, siendo los niveles de IGF1 mayores en los ratones DKO HFD en comparación con los DKO. También, se observó un aumento de BMP7 en ratones DKO HFD en comparación con los ratones DKO. Los niveles de insulina fueron mayores en ratones DKO HFD en comparación con sus controles y además estos niveles fueron mayores en comparación con los DKO. También se observó una hipertrigliceridemia en ratones DKO y DKO HFD en comparación con sus controles. Los niveles de leptina y adiponectina fueron mayores en los animales sometidos a dieta grasa tanto WT como DKO.

4.3 MITOFAGIA Y DINÁMICA MITOCONDRIAL EN PREADIPOCTIOS MARRONES DKO.

4.3.1 Generación de las líneas celulares de preadipocitos marrones neonatales DKO.

Se generaron líneas celulares de preadipocitos marrones a partir de ratones neonatos *Igf1r*^{loxP/loxP}, *Irf*^{loxP/loxP} de aproximadamente 2-3 días de vida. Tras su immortalización, se procedió a la delección de ambos receptores mediante la transducción de las mismas con Adenovirus que codificaban la recombinasa Cre. Como resultado pudimos obtener tanto la línea celular WT (*Igf1r*^{loxP/loxP}, *Irf*^{loxP/loxP}) como la línea celular DKO.

Para corroborar la delección de ambos receptores, se chequearon en ambas líneas celulares tanto el receptor de insulina como el de IGF1 mediante *Western blot*. Los resultados mostraron una completa ausencia de ambos receptores en la línea celular DKO (Figura 4.48 A). Por otra parte, se comprobó que las líneas celulares fueran capaces de diferenciarse a adipocitos marrones maduros. Para ello tras someter a las células a un cóctel de diferenciación durante 7 días, se chequeo mediante un microscopio invertido el cambio de morfología de las células, así como la presencia de una disposición de vacuolas lipídicas multilocular. Los resultados nos mostraron que mientras que las células WT fueron capaces de diferenciarse, las DKO no pudieron hacerlo (Figura 4.48 B). Este hecho, corroboró la importancia de la presencia de ambos receptores durante el proceso de diferenciación de los preadipocitos marrones

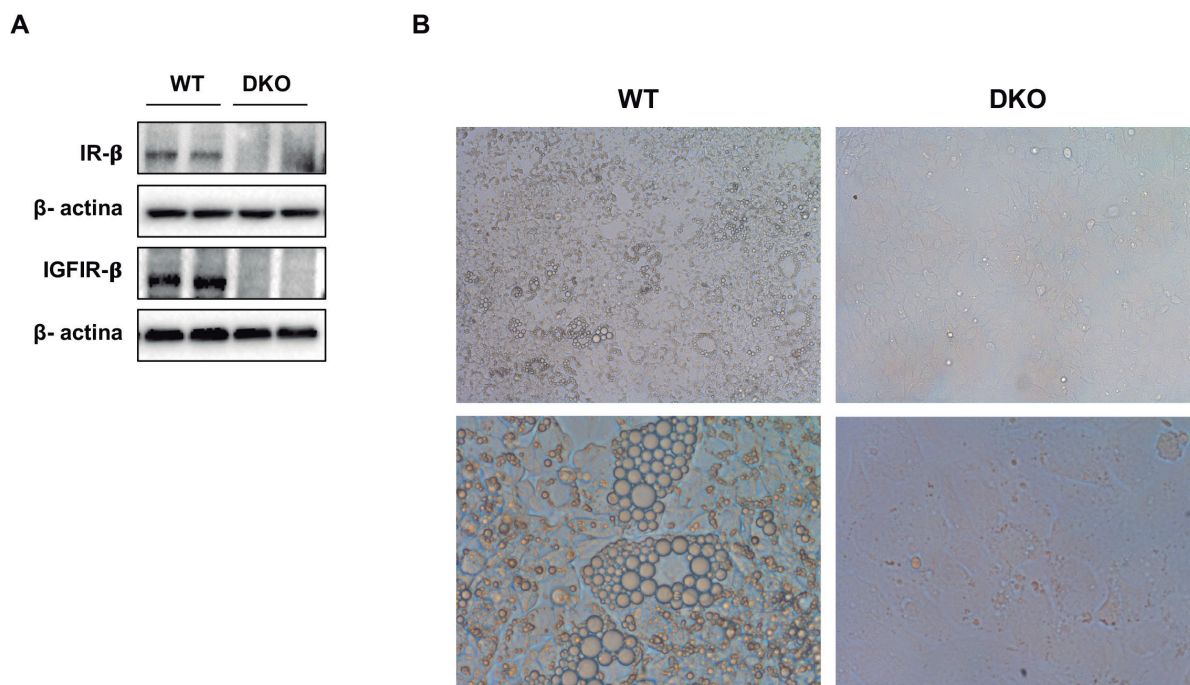


Figura 4.48. A: Blots representativos de las proteínas IR-β e IGFIIR-β en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=4) y DKO (n=4). B: Imágenes representativas del día 7 del proceso de diferenciación de las líneas celulares. Arriba se muestran imágenes tomadas con un objetivo 10X y en la parte de debajo de muestra un detalle de las células, con un objetivo 40X.

4.3.2 Estudio de la mitofagia y la dinámica mitocondrial en preadipocitos DKO.

Debido a la escasa disponibilidad de tejido en los ratones DKO, este hecho supuso un paso limitante para la realización de ciertos experimentos. Por ello, decidimos generar las líneas celulares de preadipocitos marrones WT y DKO con el fin de disponer de otra herramienta complementaria para llevar a cabo los estudios de mitofagia y dinámica mitocondrial.

En este sentido, tras las deficiencias observadas en distintas proteínas involucradas tanto en el proceso mitofágico como en la

dinámica mitocondrial en ratones DKO, se decidió evaluar estas proteínas en las líneas celulares con el fin de observar las posibles semejanzas o diferencias entre ambos sistemas. En primer lugar, se analizó mediante *Western blot* la presencia de proteínas implicadas en los procesos de autofagia o mitofagia. Al igual que lo descrito anteriormente en los ratones DKO, en las células DKO observamos una disminución de los niveles de PINK-1, sin afectación de los niveles de la forma LC3B lipidada. Sin embargo, en las células DKO, se observó un aumento de los niveles proteicos de la proteína integral de membrana mitocondrial VDAC, sin cambios en los niveles de la proteína p62 (Figura 4.49).

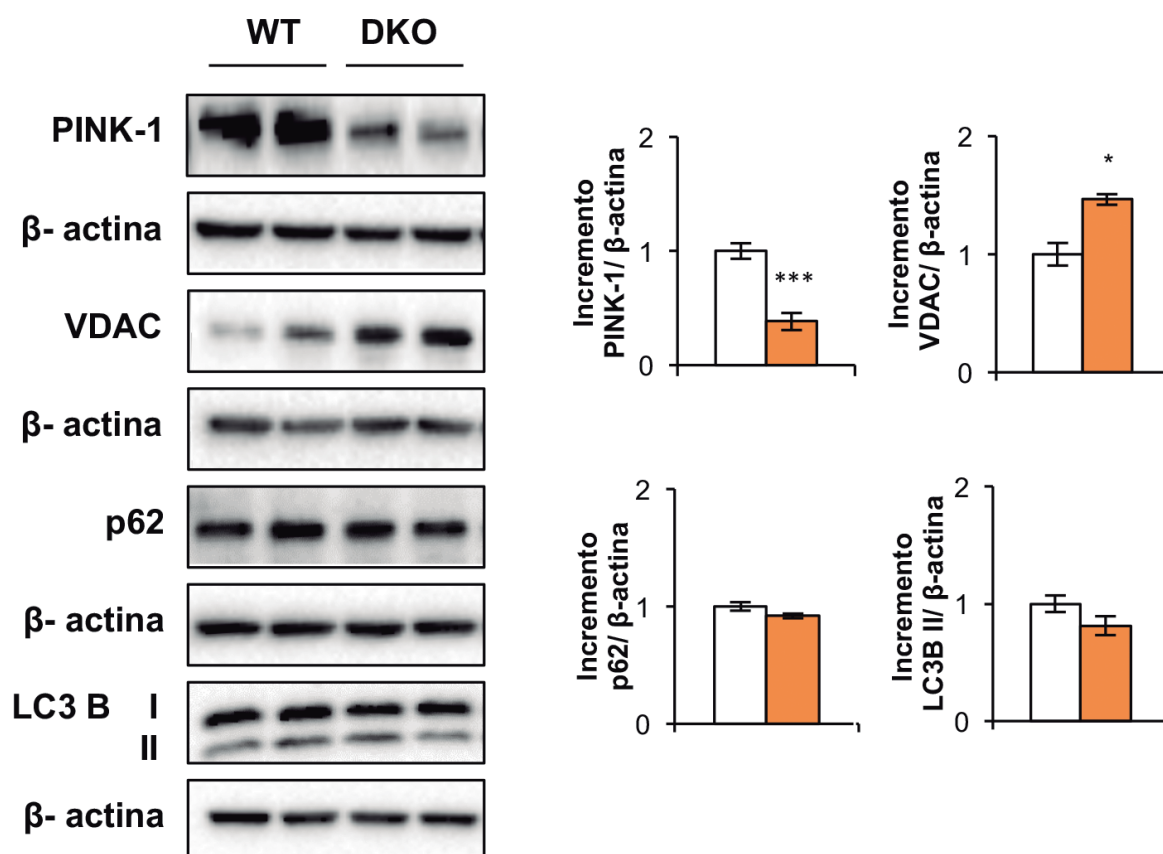


Figura 4.49. Blots representativos de las proteínas PINK-1, VDAC, p62 y LC3B-II en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=4) y DKO (n=4) y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados fueron expresados como la media±SEM. El análisis estadístico aplicado fue una t de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * P<0,05; ***P<0,001 entre las líneas celulares WT y DKO.

Por otra parte, también se analizaron distintas proteínas implicadas en los procesos de fusión y fisión mitocondriales. Los resultados nos indicaron un aumento de las proteínas de fusión Mitofusina 1 (MFN-1), Mitofusina 2 (MFN-2) y OPA-1 (predominando la forma S-OPA-1) siendo Mitofusina 2 la más abundante en las células DKO. Además, también se observó un aumento de la proteína de fisión DRP1 en las células DKO (Figura 4.50). Estos resultados, no van en la misma dirección que los observados en los ratones DKO *in vivo*, probablemente debido al aumento de la masa mitocondrial observado en las células DKO, hizo que todas las proteínas mitocondriales tanto de fusión como de fisión se vieran aumentadas.

A continuación, una vez estudiados los niveles de proteínas en condiciones basales, se decidió llevar a cabo algunos estudios donde se trató de inducir el proceso de mitofagia mediante la utilización del agente desacoplante CCCP. Para ello, en primer lugar, se realizó una curva de dosis-respuesta con el fin de seleccionar la concentración óptima de CCCP a utilizar. Tras estimular las células con diferentes dosis de CCCP 1, 10, 20 y 50 μM durante 4h, se analizó si estas dosis fueron capaces de inducir la mitofagia mediante el análisis de una de las proteínas implicadas en este proceso, PINK-1. Los resultados nos indicaron que las células DKO presentaron menores niveles de PINK-1 en condiciones basales como habíamos observado previa-

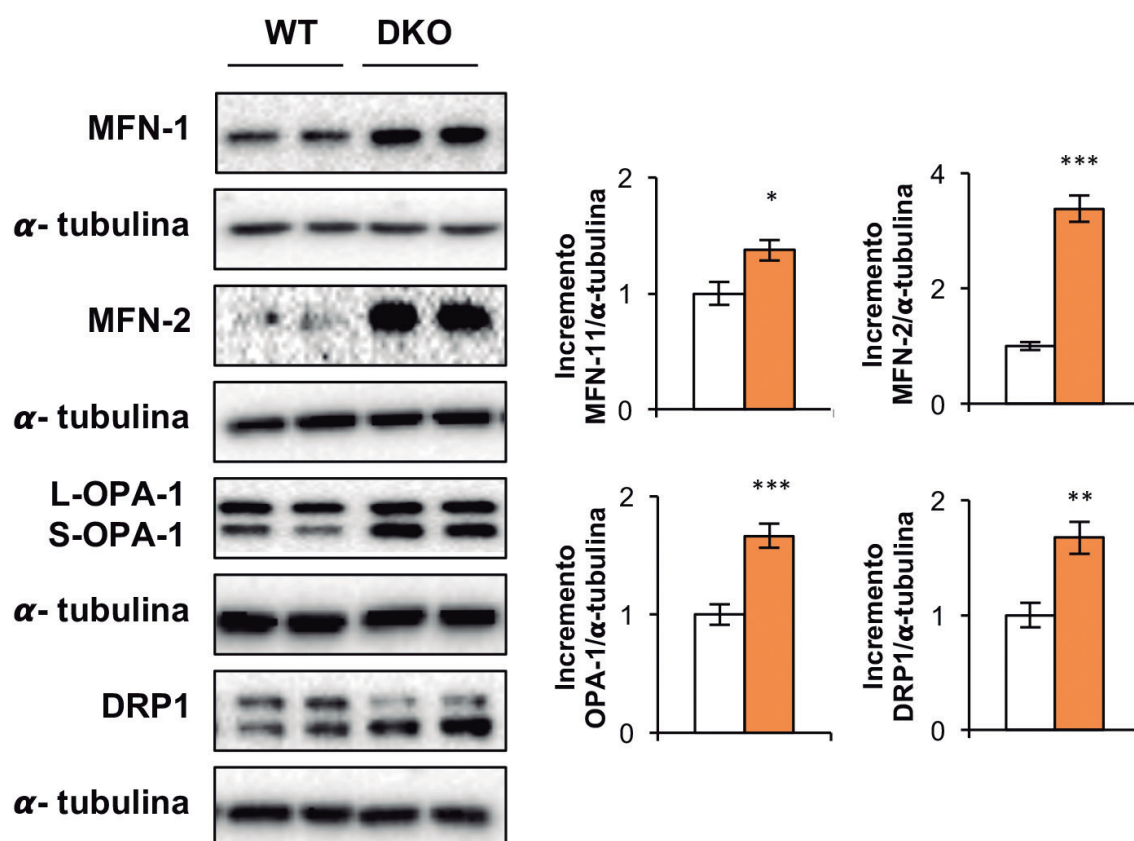


Figura 4.50. Blots representativos de las proteínas MFN-1, MFN-2, OPA-1 y DRP1 en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=4) y DKO (n=4) y sus correspondientes cuantificaciones. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ entre las líneas celulares WT y DKO.

mente y, además, estas células necesitaron mayores dosis de CCCP para inducir de manera efectiva el proceso mitofágico. A la vista de los resultados, elegimos la dosis de CCCP 20 μ M como una dosis efectiva para la inducción de la mitofagia (Figura 4.51).

Una vez establecida la dosis óptima de CCCP, se realizaron varios experimentos donde las células fueron estimuladas con CCCP 20 μ M

durante 15 h para inducir la mitofagia o bien con CCCP 20 μ M y CQ 20 μ M durante 15h para bloquear el flujo autofágico. Tras analizar la forma lipídada de la proteína LC3B (común tanto en mitofagia como en procesos de autofagia en general) los resultados demostraron que tanto las células WT como las DKO presentaron un correcto flujo autofágico. (Figura 4.52).

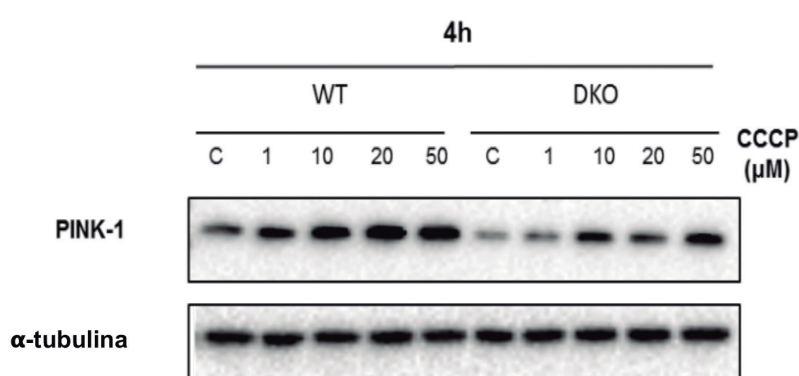


Figura 4.51. Blot representativo de la curva de dosis-respuesta de CCCP a las concentraciones 1, 10, 20 y 50 μ M en células WT y DKO donde se analizó la respuesta a este compuesto mediante la visualización de la proteína PINK-1.

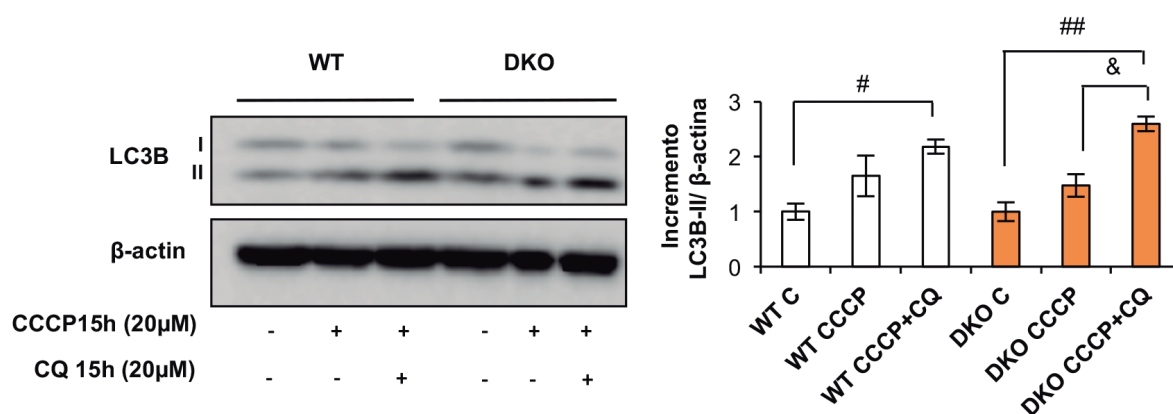


Figura 4.52. Blot representativo de la proteína LC3B en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=3) y DKO (n=3) en condiciones basales, estimuladas con CCCP 20 μ M durante 15h o estimuladas con CCCP+CQ 20 μ M durante 15h y su correspondiente cuantificación. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue un Anova de una vía seguido del post-test Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas #P<0,05; ##P<0,01 entre grupos control y CCCP+CQ de células WT o DKO; &P<0,05 entre grupos CCCP y CCCP+CQ de células WT o DKO.

A continuación, se quiso comprobar mediante inmunofluorescencia de la proteína de matriz mitocondrial HADHA, si tras la inducción de la mitofagia en las células WT y DKO mediante la estimulación con CCCP 20 μ M durante 15 o 24h o tras inducir la mitofagia con CCCP 20 μ M y bloquear el flujo autofágico con CQ 20 μ M durante 15h, el aclaramiento de las mitocondrias despolarizadas por CCCP se vio afectado de manera diferencial.

Los resultados mostraron una disminución de la fluorescencia de HADHA, utilizado como marcador mitocondrial, tras la estimulación con CCCP 20 μ M a 15h y en mayor medida a 24h en las células WT. Además, tras el bloqueo del flujo autofágico mediante la estimulación con cloroquina, se observó una acumulación de las mitocondrias despolarizadas por CCCP en las células WT. Sin embargo, las células DKO solamente presentaron una ligera disminución de la fluorescencia de HADHA tras la estimulación con CCCP 20 μ M tanto a 15 como a 24h, indicando un posible defecto en el aclaramiento de las mitocondrias despolarizadas ([Figura 4.53](#)).

Tras observar que las células DKO podrían presentar un defecto en el aclaramiento de las mitocondrias despolarizadas por CCCP, nos planteamos estudiar si el proceso mitofágico a nivel de la proteína adaptadora p62 se vio afectado de igual manera en las células DKO. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia de TOM20 (marca las mitocondrias en rojo), p62 (proteína adaptadora marcada en verde) y DAPI (marca los ácidos nucleicos en azul) en células estimuladas con CCCP 20 μ M durante 4 h. Los resultados demostraron que las células DKO presentaron una menor colocación de las proteínas TOM20 y p62 tras la inducción de la mitofagia con CCCP. Este hecho indica que las mitocondrias dañadas no son correctamente marcadas con la proteína p62 para su posterior inclusión en el autofagosoma, paso imprescindible para su correcta degradación ([Figura 4.54](#)).

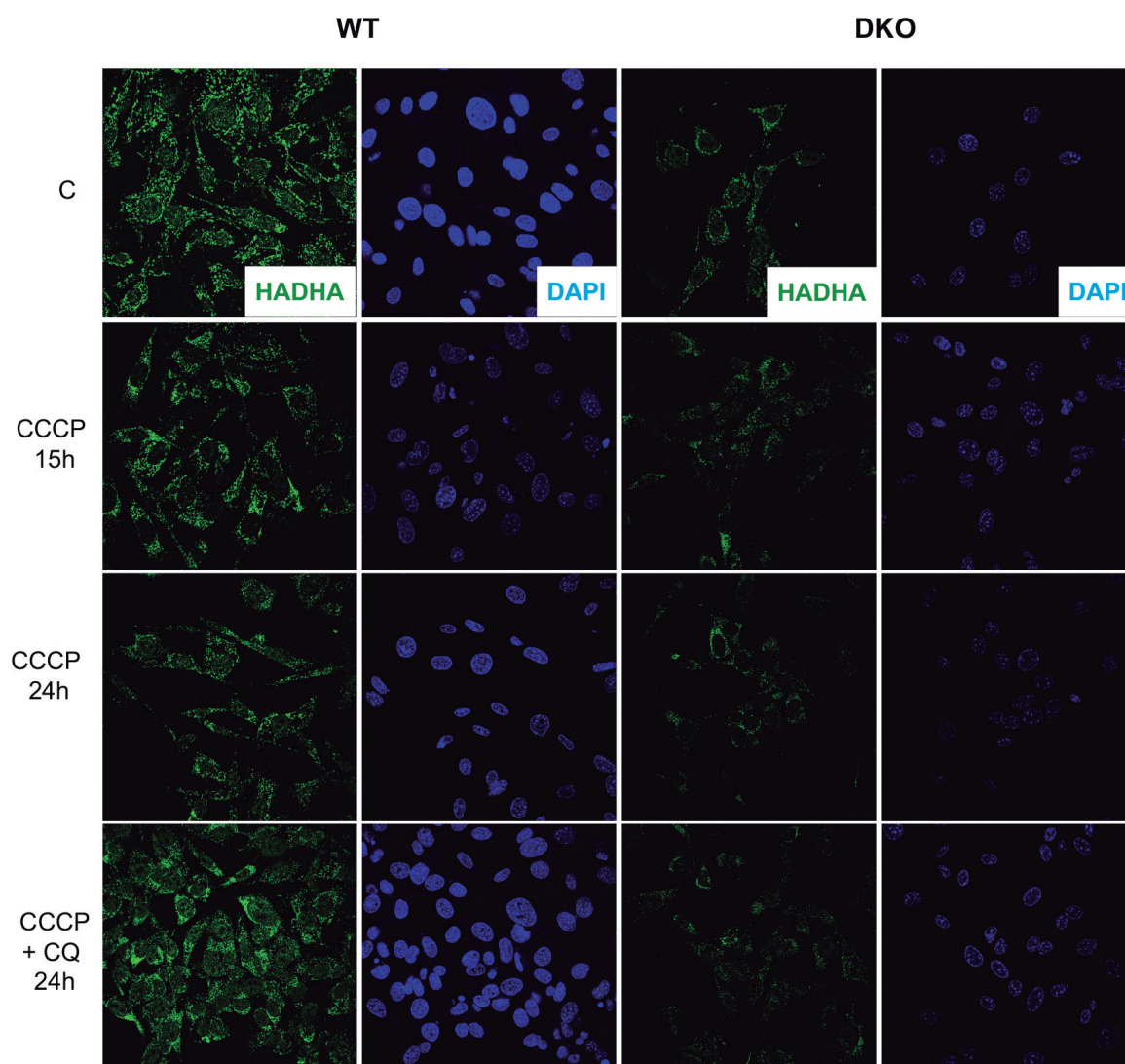


Figura 4.53. Inmunofluorescencia representativa de la proteína HADHA (marca a las mitocondrias en verde) y DAPI (marca los ácidos nucleicos en azul) en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=4) y DKO (n=4) en condiciones basales, estimuladas con CCCP 20 μ M durante 15h o 24h y estimuladas con CCCP+CQ 20 μ M durante 24h. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo 63X.

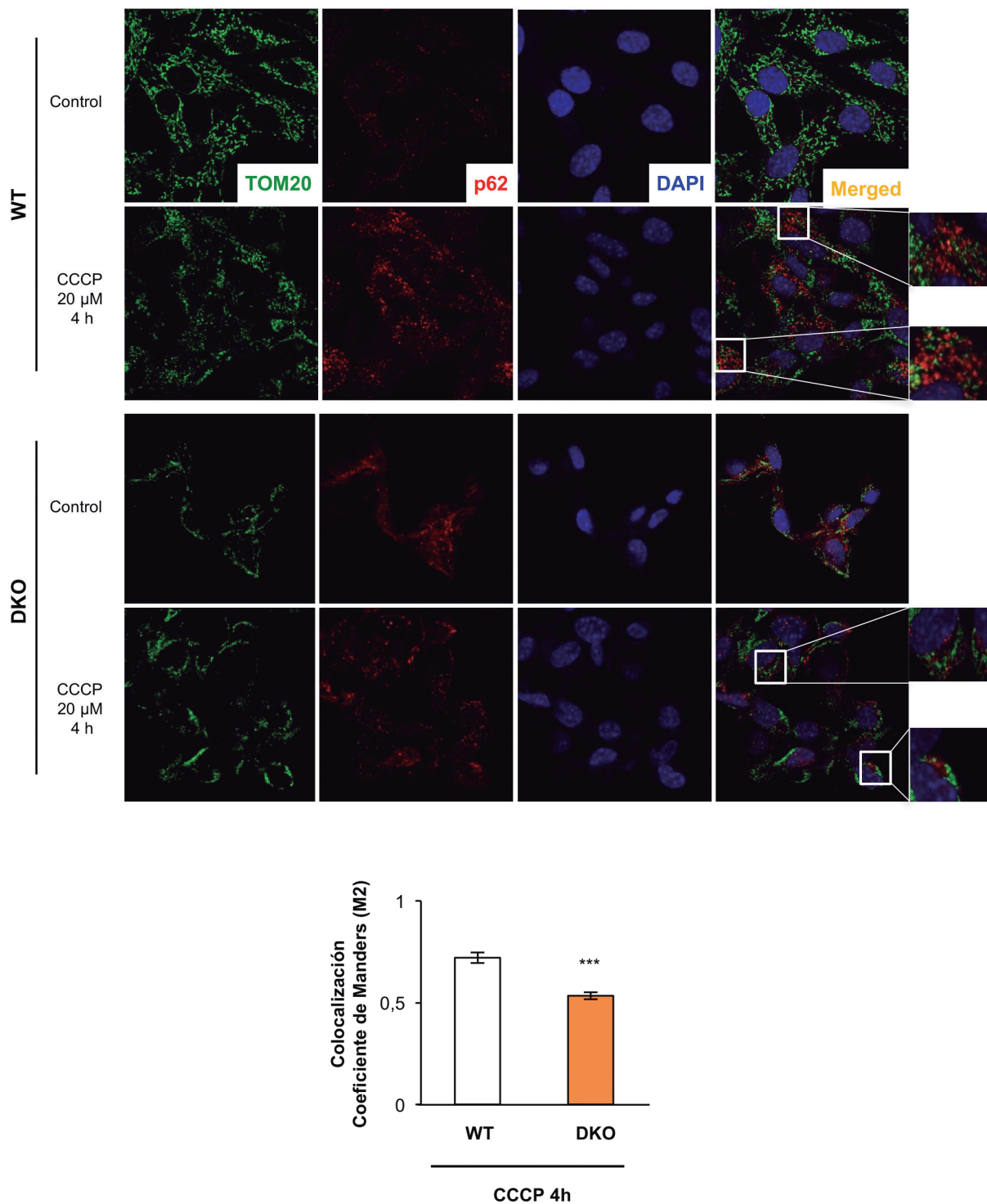


Figura 4.54. Inmunofluorescencia representativa de las proteínas TOM20 (marca a las mitocondrias en verde), p62 (marca a la proteína adaptadora en rojo), DAPI (marca los ácidos nucleicos en azul) y su colocalización en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=3) y DKO (n=3) en condiciones basales o estimuladas con CCCP 20 μ M durante 4h. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo 63X. La cuantificación de la colocalización de las proteínas TOM20 y p62 observada se midió utilizando el coeficiente de Manders. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM. El análisis estadístico aplicado fue una *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas *** P<0,001 entre las líneas celulares WT y DKO.

4.3.3 Papel del receptor de insulina y del de IGF1 sobre la respiración y el potencial de membrana mitocondrial.

Previamente a estos estudios, durante mi estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Orian Shirihai (Boston University) y bajo la supervisión del Dr. Marc Liesa, estas líneas celulares fueron utilizadas para estudiar el papel del receptor de insulina y de IGF1 en la respiración y potencial de membrana mitocondriales.

Para analizar la capacidad respiratoria de las células se utilizó el sistema Seahorse®. Gracias a este sistema pudimos analizar la

tasa de consumo de oxígeno tanto en condiciones basales como tras la adición de distintos compuestos: Oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa, bloquea el canal de protones de la subunidad F_0), FCCP (agente desacoplante, desacopla la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP), Antimicina A (inhibidor del complejo III). Los resultados nos indicaron que las células DKO, presentaron una mayor demanda de síntesis de ATP mitocondrial, ya que tras la adición de Oligomicina la caída en la tasa de consumo de oxígeno fue mayor en comparación con las células WT. Además, las células DKO mostraron una mayor capacidad respiratoria máxima, ya que se observó un gran incremento en la tasa de consumo de oxígeno tras la adición de FCCP (Figura 4.55).

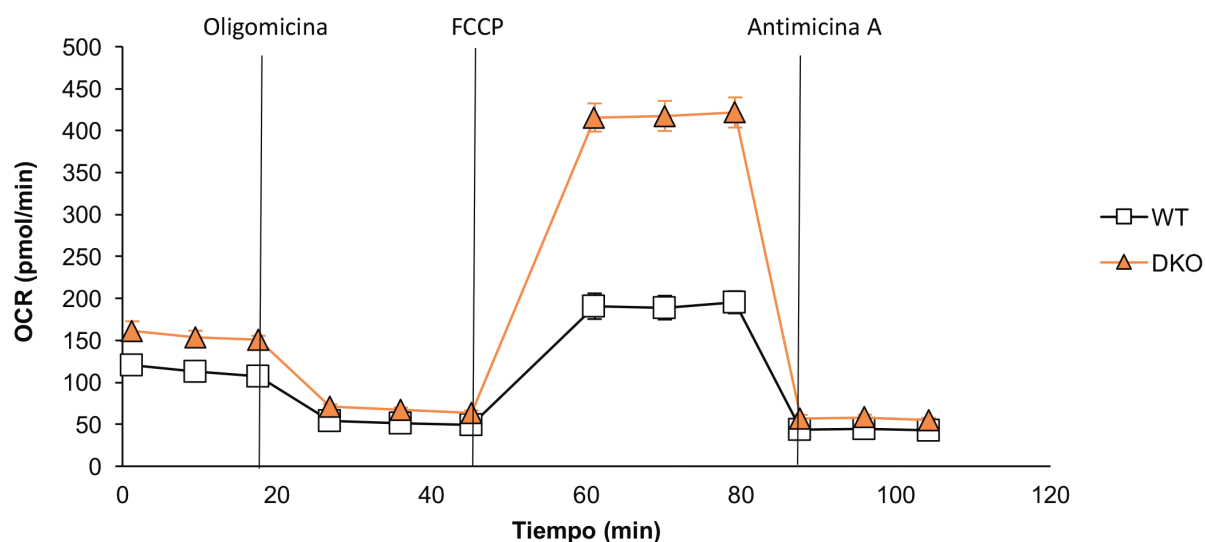


Figura 4.55. Experimento representativo de los resultados de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en las líneas celulares de preadipocitos marrones WT (n=5) y DKO (n=5) en condiciones basales o tras la adición de Oligomicina, FCCP o Antimicina A. Los resultados fueron expresados como la media±SEM.

Para estudiar posibles variaciones en el potencial de membrana en las células WT y DKO, se estudió por inmunofluorescencia el ratio TMRE/MTG en células que habían sido sometidas a un proceso de diferenciación de 7 días, tanto en condiciones basales como tras inducir la despolarización mediante el uso de noradrenalina 10 μ M durante 45 min. Como se comentó en el apartado de materiales y métodos, TMRE (Tetrametilrodamina etil-ester) es un colorante fluorescente rojo-naranja que entra y sale de las mitocondrias en función de los cambios del potencial de membrana, mientras que MTG (*MitoTracker Green*) es un colorante fluorescente verde que se une covalentemente a las mitocondrias independientemente de su potencial de membrana. De esta manera, al combinar ambos colorantes cuando las mitocondrias es-

tán hiperpolarizadas predominará el TMRE observándose las mitocondrias de un color naranja mientras que cuando están despolarizadas, TMRE va a salir de las mitocondrias y permanecerá únicamente la fluorescencia verde del MTG unido covalentemente (Figura 4.56 A).

Los resultados indicaron que tanto las células WT como DKO fueron capaces de inducir la despolarización de sus mitocondrias tras la adición de noradrenalina 10 μ M durante 45min al medio de cultivo. Se observó que en células WT, la noradrenalina ocasionó la despolarización del 53% de células y la hiperpolarización del 47% restante. Sin embargo, en el caso de las células DKO, la despolarización fue inducida en un 67% de las células y tan solo un 33% de las células sufrió una ligera hiperpolarización (Figura 4.56 B).

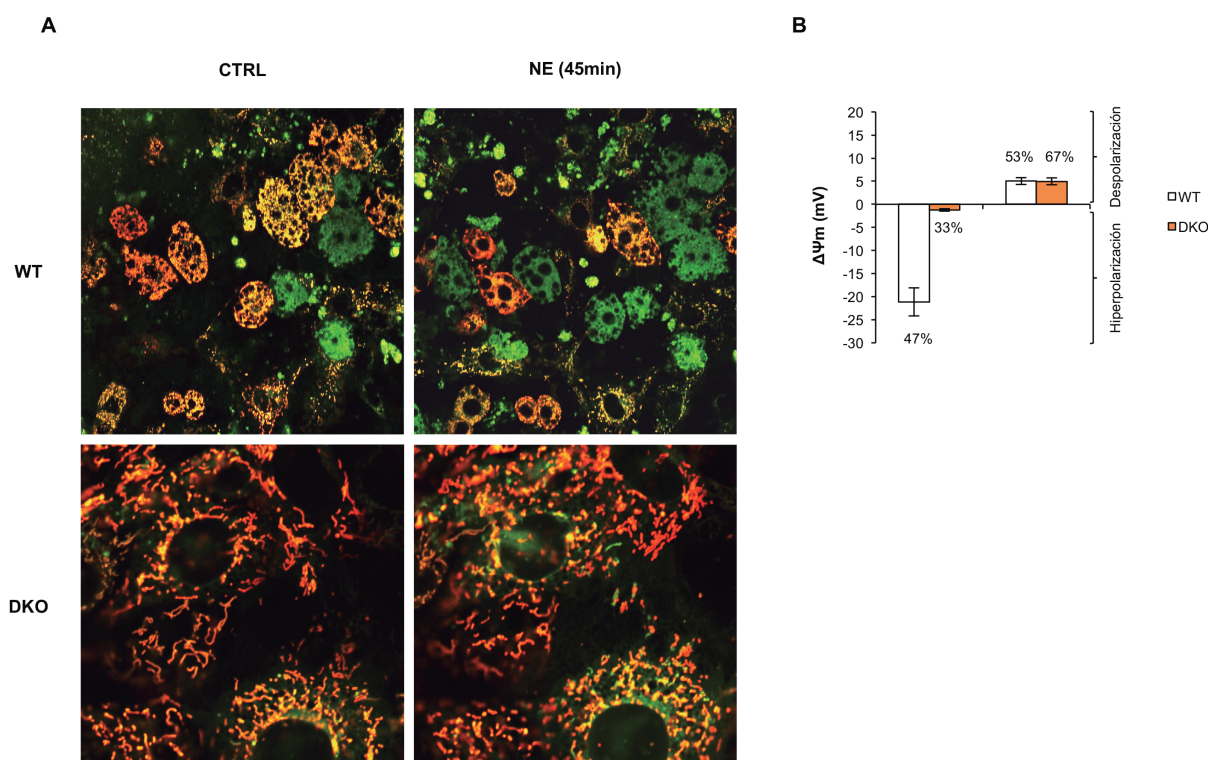


Figura 4.56. **A:** Imágenes representativas de la tinción TMRE/MTG utilizada para medir las variaciones en el potencial de membrana de preadipocitos marrones WT (n=2) y DKO (n=2) diferenciados durante 7 días en condiciones basales o tras la estimulación con noradrenalina durante 45 min. **B:** Cuantificación de la variación en el potencial de membrana de preadipocitos marrones WT (n=17 células analizadas) y DKO (n=10 células analizadas) diferenciados durante 7 días tras la estimulación con noradrenalina durante 45 min. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM.

DISCUSIÓN

El descubrimiento de la presencia de tejido adiposo marrón metabólicamente activo en humanos adultos (van Marken Lichtenbelt WD *et al*, 2009; Cypess AM *et al*, 2009; Virtanen KA *et al*, 2009) y su ausencia de función en sujetos obesos, han hecho que, en los últimos años el tejido adiposo marrón sea considerado como una posible diana para el tratamiento de la obesidad.

Estudios en modelos animales y en cultivos celulares han demostrado la gran importancia del IGF1 y su receptor en numerosas funciones biológicas del tejido adiposo marrón como: diferenciación (Mur C *et al*, 2003; Cypess AM *et al*, 2011), supervivencia (Navarro P *et al*, 1998 y 1999; Valverde AM *et al*, 2004) y termogénesis (Sanchez-Alvarez M *et al*, 2011).

Aunque el IGF1 se expresa a bajos niveles en la etapa embrionaria se ha comprobado que su señalización es esencial tanto para un normal desarrollo embrionario como para el correcto crecimiento y desarrollo postnatal (Powell-Braxton L *et al*, 1993; Liu JP *et al*, 1993). El hecho de que el tejido adiposo marrón se desarrolle principalmente durante la etapa fetal (Rajan S *et al*, 2014), hace que el factor IGF1 y su receptor jueguen un papel fundamental en el desarrollo y/o funcionalidad de este tejido.

En este sentido, la generación del modelo *knockout* de IGF1R específico de tejido marrón (BATIGIRKO) demostró que el IGF1R no es esencial para el desarrollo del BAT de la misma manera que la delección del IGF1R en la célula β ($\beta\text{Igf1r}^{-/-}$) no fue imprescindible para el desarrollo normal de la masa de célula β pancreática (Kulkarni RN *et al*, 2002). Mientras que los mayores niveles de IGF1 circulantes observados en el modelo IGF1R^{aP2Cre} (presenta una delección del IGF1R tanto en tejido adiposo blanco como marrón) fueron responsables de un aumento del crecimiento de estos animales (Klötting N *et al*, 2008), en el modelo BATIGIRKO los aumentos de IGF1 plasmáticos no se correlacionaron con alteraciones en el crecimiento. Sin embargo, en ambos modelos la delección del IGF1R ocasionó un aumento de los niveles circulantes de IGF1, hecho que sugiere la existencia de un posible mecanismo compensatorio ante la falta del receptor.

La ausencia de efecto de la delección del IGF1R en el desarrollo del BAT y la ligera afectación de la función termogénica, nos sugiere la posible existencia de mecanismos compensatorios. En consecuencia, se exploró la señalización de posibles candidatos tales como la insulina y el BMP7, así como las hormonas tiroideas.

En animales BATIGFIRKO, se observó un aumento de las principales proteínas implicadas en la señalización de la insulina como el IRS1, el IRS2 y la PI3K, así como un ligero aumento del IR. Estas evidencias sugerían que cuando el IGF1R fue deletado el IR asumió la gran parte de las funciones del IGF1R. En nuestro laboratorio, ya habíamos observado que este mecanismo también ocurría en el sentido contrario. Por una parte, encontramos que tanto los hepatocitos neonatales como las células de músculo liso vascular IRKO mostraron mayores niveles de IGF1R en comparación con sus controles (IRloxP) (Díaz-Castroverde S *et al.*, 2016; Beneit N *et al.*, 2016). Además, los estudios llevados a cabo con adipocitos marrones IGF1R ^{-/-} mostraron una mayor sensibilidad a la insulina vía IRS-1/Grb-2/MAPK (Mur C *et al.*, 2002).

BMP7 ha sido identificado como uno de los principales factores implicados en la diferenciación de los adipocitos marrones junto con el factor transcripcional Prdm16 (Boon MR *et al.*, 2011). Ratones BMP7 KO demostraron la importancia de este factor en la formación y funcionalidad del BAT. Ratones BMP7 KO recién nacidos, presentaron una reducción de entre el 50-70% del BAT y una total ausencia de la proteína UCP1 (Tseng YH *et al.*, 2008). El modelo BATIGFIRKO presentó unos menores niveles proteicos de BMP7 y p-Smad 1/5/8 en el BAT a los 3 meses indicando una afectación tanto en la producción como en la señalización del BMP7. Por el contrario, en animales de 12 meses, se observó un aumento de los niveles proteicos de ACVR1 (receptor de tipo I) y p-Smad 1/5/8, mientras que los niveles de BMP7 se igualaron a los observados en los ratones control. El aumento de la maquinaria de la señalización de BMP7 observada a los 12 meses fue acompañada de una reducción de sus niveles plasmáticos, lo cual hizo descartar que dicha señalización pudiese compensar la ausencia del IGF1R en el BAT. No obstante, una posible

explicación a este aumento de señalización de BMP7 a pesar de los bajos niveles plasmáticos podría deberse a un *cross talk* entre la vía de señalización de la insulina y el BMP7, previamente descrito en preadipocitos marrones IRS1KO (Zhang H *et al.*, 2010).

El último potencial mecanismo compensatorio estudiado fue el llevado a cabo por las hormonas tiroideas. Diversos estudios han demostrado que el BAT es diana de las hormonas tiroideas y que este tejido presenta un gran número de receptores de hormonas tiroideas α_1 y β_1 (Hernandez A y Obregón MJ, 1996). Mientras que la isoforma α_1 es necesaria para el mantenimiento de la respuesta adrenérgica, la isoforma β_1 es necesaria para inducir la expresión de UCP1 en los adipocitos marrones (Ribeiro MO *et al.*, 2001). Ratones deficientes de las isoformas α del receptor de hormonas tiroideas (TRalpha-0/0), presentaron una severa deficiencia en la termogénesis inducida por el frío a pesar de que la enzima *Dio2* (convierte T4 en T3) respondió de manera adecuada a la estimulación por frío, aumentando sus niveles (Marri H *et al.*, 2005). Además, la conversión de T4 a T3 mediada por la enzima *Dio2*, es esencial para el mantenimiento de una correcta respuesta termogénica en el BAT (Bianco AC *et al.*, 2002). En los ratones BATIGFIRKO observamos un aumento de los niveles de T3 en plasma a los 12 meses, el cual fue acompañado de una ligera disminución de los niveles de *Dio2*. Este hecho, sugiere que el aumento de los niveles plasmáticos de T3 se debe a una producción en otros tejidos tales como el SNC o el músculo esquelético.

Globalmente, nuestros resultados sugieren que la presencia del IGF1R no es esencial para el desarrollo del BAT, siempre y cuando ello se produzca en presencia del IR o de elevados niveles circulantes de IGF1.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado la importancia del receptor de

IGF1 en el proceso adipogénico y termogénico de los adipocitos marrones (Mur C *et al.*, 2003).

Para que el proceso termogénico que tiene lugar en el BAT pueda funcionar correctamente tienen que darse una serie de pasos: 1) Correcta innervación simpática con el fin de inducir la activación de los receptores β_3 adrenérgicos 2) Activación de PKA que conlleva la iniciación del proceso lipolítico de las gotas lipídicas de los adipocitos 3) Transporte de los ácidos grasos libres al interior de la mitocondria mediante los transportadores CTP-I y II 4) Obtención de poder reductor (FADH y NADH) mediante la β oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs 5) La presencia de la proteína UCP1, la cual se encarga de colapsar la fuerza protón-motriz generada en la cadena de transporte electrones, para generar calor (Cannon B y Nedergaard J, 2004).

La sobreexpresión de CPTI-M en adipocitos marrones conlleva un aumento de la oxidación de los ácidos grasos, lipólisis, expresión de UCP1 y respiración mitocondrial (Calderón-Domínguez M *et al.*, 2016). Sin embargo, el modelo BATIGFIRKO a los 3 meses a pesar de presentar una mayor lipólisis y mayores niveles de HSL y CPTI-M, mostraron un moderado defecto termogénico tras 12 horas de exposición al frío y un menor gasto energético, probablemente asociado a unos menores niveles de la proteína UCP1. A los 12 meses, también se observó un moderado defecto termogénico asociado a unos menores niveles de la proteína UCP1, independientemente del aumento de la lipólisis, de los niveles proteicos de HSL y CPTI-M y del aumento de la expresión de Prdm16. En estas condiciones, no se observaron alteraciones en el gasto energético. El mantenimiento del gasto energético en los animales BATIGFIRKO de 12 meses puede ser debido a un aumento del tono simpático en el BAT mediado por el

aumento de los niveles de T3 plasmáticos. El aumento de T3 en plasma puede ejercer efectos en el núcleo ventromedial del hipotálamo donde disminuye la fosforilación y la activación de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) lo cual permite aumentar el tono simpático que inerva al BAT (López M *et al.*, 2010).

La habilidad de los adipocitos *beige* presentes en diferentes compartimentos adiposos blancos para inducir grandes aumentos en los niveles de ARNm de *Ucp1* bajo determinados estímulos, ha hecho que la inducción de estas células sea considerada como una posible terapia anti-obesidad. Además, ha sido demostrado que la proteína UCP1 presente en los adipocitos *beige* del tejido adiposo inguinal tiene potencial suficiente para participar en el proceso termogénico (Shabalina IG *et al.*, 2013). En el modelo BATIGFIRKO observamos que el aumento de la expresión de Prdm16 en el tejido adiposo inguinal de ratones de 3 y 12 meses no se correlacionó con un aumento de los niveles de UCP1.

Ha sido descrito que el reclutamiento de PRDM16 a la región potenciadora (*enhancer*) del gen *Ucp1* es mediado tanto por PGC1- α como por MED-1 (proteína mediadora de la transcripción de la subunidad 1 de la ARN polimerasa). Además, el reclutamiento de PRDM16 mediado por MED-1 o PGC1- α requiere que ambos factores interaccionen previamente con los receptores nucleares de hormonas tiroideas (TR α /RXR α) (Iida S *et al.*, 2015). A la vista de los resultados observados tanto en el BAT de animales BATIGFIRKO de 12 meses como en el tejido adiposo inguinal de animales BATIGFIRKO de 3 y 12 meses, podemos sugerir una posible afectación del reclutamiento de PRDM16 a la región potenciadora del gen de *Ucp1*.

En términos bioenergéticos, el desarrollo de obesidad de manera espontánea puede ser

debido a una deficiente función o una actividad insuficientemente alta del BAT, ya que la principal función de este tejido es utilizar el exceso de nutrientes para generar calor (Medvedev LN y Elsukova EI, 2016). En este sentido, en el modelo BATIGFIRKO no se observaron diferencias ni en el peso corporal ni en el volumen de grasa corporal en comparación con los ratones control, a los 3 o a los 12 meses de vida. Sin embargo, se observó una redistribución de los lípidos entre los compartimentos grasos en los ratones BATIGFIRKO, representados por una mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal a los 3 y a los 12 meses, así como una hipertrofia de los adipocitos blancos del rWAT a 3 y 12 meses y del eWAT a los 12 meses.

Se han asociado alteraciones en las concentraciones de adipoquinas circulantes con la hipertrofia de los adipocitos (Blüher M y Mantzoros CS, 2015). La presencia de adipocitos hipertróficos, presentes en humanos y ratones obesos, está asociada con altos niveles de leptina y bajos niveles de adiponectina circulantes (van Harmelen V *et al.*, 1998; Arita Y *et al.*, 2012). También se ha visto que la hipertrofia de los adipocitos está asociada a un aumento de la muerte celular, hecho que produce un aumento de la infiltración de macrófagos de tipo M1 que van a liberar citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, and IL-1 β (Rodríguez A *et al.*, 2015). En este sentido, debido a la presencia de adipocitos hipertróficos en algunos de los compartimentos grasos de los ratones BATIGFIRKO, se estudiaron los niveles de las adipoquinas leptina, adiponectina y TNF- α . Los resultados no indicaron alteraciones en los niveles plasmáticos de ninguno de estas adipoquinas en los ratones BATIGFIRKO de 3 y 12 meses.

La movilización de lípidos que tiene lugar entre algunos de los compartimentos grasos en los ratones BATIGFIRKO, se ve reflejada en un aumento de los triglicéridos circulantes

tanto a 3 como a 12 meses. Este aumento de triglicéridos puede depositarse de manera ectópica en tejidos periféricos ocasionando alteraciones en la sensibilidad a la insulina. En este sentido observamos que los ratones BATIGFIRKO no presentaron cambios en la tolerancia a la glucosa, pero con la edad desarrollaron una resistencia a la insulina que fue asociada con un ligero aumento de los niveles de insulina plasmáticos. De manera paralela se observó un aumento del contenido lipídico en el hígado, responsable de la deficiente señalización de la insulina en animales BATIGFIRKO de 12 meses.

Probablemente el mecanismo mejor conocido de regulación del gasto energético es el que viene mediado por la proteína desacoplante-1 mitocondrial (UCP1) del tejido adiposo marrón. No fue hasta 1997 cuando se identificaron diferentes proteínas desacoplantes homologas a UCP1 en distintos tejidos periféricos. El porcentaje de homología con UCP1 dependió según la proteína, así UCP2 presentó un 54%, UCP3 un 57% y UCP4 un 34% (Ricquier D y Bouillaud F, 2000). UCP2 se expresa fundamentalmente en macrófagos, bazo, intestino, páncreas, pulmón e hígado; UCP3 en músculo esquelético, corazón y BAT y UCP4 en cerebro (Busiello RA *et al.*, 2015). A pesar de su homología, se ha corroborado que estas proteínas no están involucradas en la termogénesis adaptativa o en la regulación del peso corporal (Harper ME y Himms-Hagen J, 2001). Se ha descrito que sus principales funciones son la regulación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), en la regulación de la oxidación de ácidos grasos en las mitocondrias (Azzu V *et al.*, 2010) y en la secreción de la insulina (Diano S y Horvath TL, 2012). El estudio de los niveles de UCP2 en hígado y UCP3 en músculo esquelético y corazón de ratones WT y BATIGFIRKO, reveló únicamente alteraciones en los niveles de UCP3. En este sentido, los animales BATIG-

FIRKO presentaron mayores niveles de UCP3 en corazón y menores niveles en el músculo esquelético. Estas alteraciones en los niveles de UCP3, fueron asociados a una expresión diferencial de los receptores β_2 adrenérgicos. Dado que la sobreexpresión de UCP3 incrementa el transporte de ácidos grasos y su oxidación (Bezaire V *et al.*, 2005), así como con un aumento de la sensibilidad a la insulina (Clapham JC *et al.*, 2000) se realizaron experimentos para comprobar la señalización a la insulina en animales alimentados con una dieta grasa no obesogénica con el fin de estudiar si las diferencias de UCP3 observadas podrían estar relacionadas con un papel protector frente al exceso de lípidos. Los resultados mostraron una severa resistencia a la insulina en el hígado de animales BATIGFIRKO. Estos resultados se correlacionan con la no alteración de los niveles de UCP2 hepáticos, de tal forma que en este tejido UCP2 no ejerció su función protectora frente al estrés oxidativo (Lee FY *et al.*, 1999) o frente a la acumulación lipídica y a la resistencia a la insulina observada en células de músculo liso vascular y en células endoteliales (Gómez-Hernández A *et al.*, 2014). En el caso del corazón de ratones BATIGFIRKO, donde se observaron mayores niveles de UCP3, no se encontraron alteraciones en la señalización de la insulina en animales alimentados con dieta grasa, hecho que corrobora el papel protector de UCP3 frente a la acumulación lipídica, así como al daño mitocondrial asociado a estados prediabéticos y diabéticos (Cole MA *et al.*, 2011). Por el contrario, en el músculo esquelético de los ratones BATIGFIRKO, donde se observó una disminución de los niveles de UCP3, se encontró una resistencia a la insulina en animales alimentados con dieta grasa, demostrando así que los bajos niveles de UCP3 se asocian con una menor oxidación de los ácidos grasos, un aumento de la acumulación lipídica (MacLellan JD *et al.*, 2005) y con la resistencia a la insulina observada en la transición hacia la diabetes

tipo 2 (Schrauwen P *et al.*, 2006). Todos estos datos, sugirieron un papel protector de la proteína UCP3 frente a los lípidos en ratones que presentan una delección del IGF1R en el tejido adiposo marrón.

En resumen (Figura 5.1), nuestros datos sugieren que el IGF1R no es esencial para el desarrollo del tejido adiposo marrón en presencia del IR y de elevados niveles de IGF1 en plasma. Sin embargo, la pérdida del IGF1R en el BAT afectó a los niveles de UCP1 tanto en el BAT y disminuyó la presencia de adipocitos *beige* en el tejido adiposo blanco inguinal. También se demostró que el IGF1R es imprescindible para el mantenimiento de una correcta función termogénica en el tejido adiposo marrón. Su delección en el BAT fue asociada con una redistribución del órgano adiposo, la cual resultó en una hipertrigliceridemia, en una moderada hiperinsulinemia y en una resistencia a la insulina hepática que resultó en una resistencia a la insulina global en ratones BATIGFIRKO de 12 meses de edad. Además, la pérdida de IGF1R en el BAT no pudo ser compensada por una elevación de la termogénesis basal o por el aumento de UCP3 en músculo esquelético mediado por los mayores niveles de T3 circulantes (Silvestri E *et al.*, 2005). Sin embargo, el aumento de UCP3 observado en el músculo cardíaco de ratones BATIGFIRKO sugirió un papel protector de UCP3 frente a la resistencia a la insulina inducida por la dieta grasa.

Tanto la insulina como el IGF1 tienen un papel fundamental en la proliferación celular, diferenciación y acumulación lipídica (Entingh-Pearsall A y Kahn CR, 2004), siendo el IGF1 el principal responsable del desarrollo del BAT durante la etapa fetal (Powell-Braxton L *et al.*, 1993; Liu JP *et al.*, 1993; Rajan S *et al.*, 2014).

Tras demostrar que el IGF1R es imprescindible para el mantenimiento de una correc-

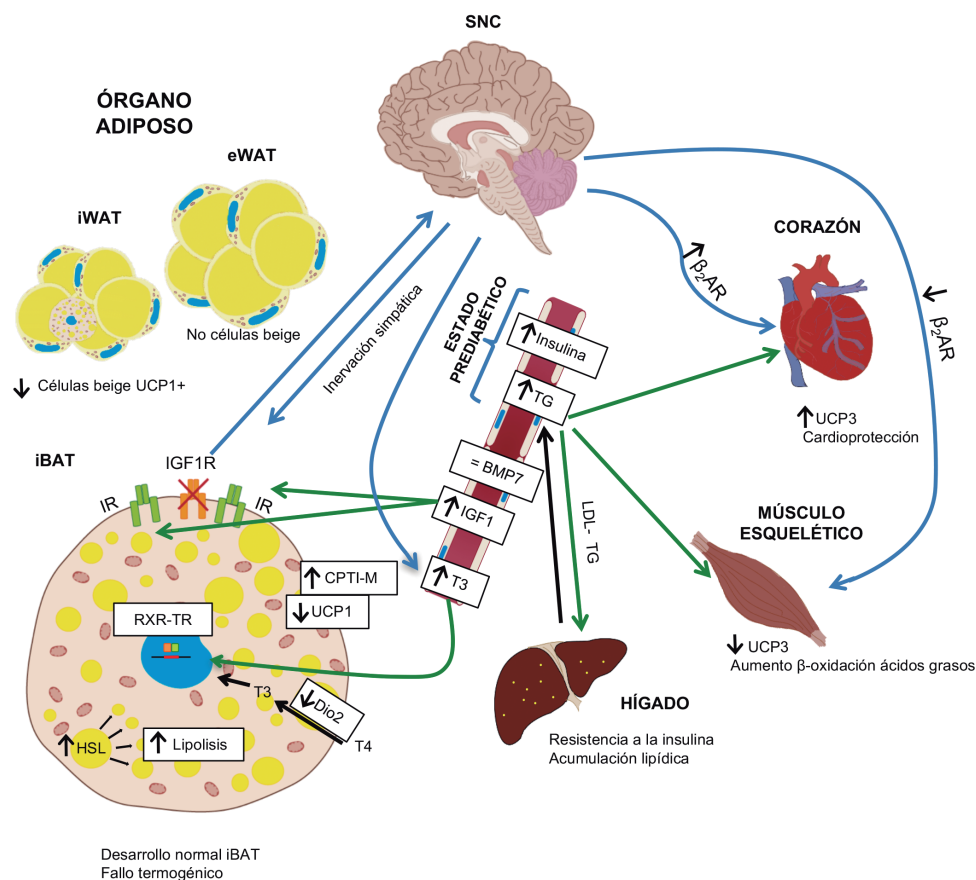


Figura 5.1. Esquema resumen del fenotipo primario y secundario observado en los ratones BATIGFIRKO.

ta función termogénica en el tejido adiposo marrón y ante el hecho de la existencia de una señalización compensatoria mediada por el receptor de insulina en el modelo BATIGFIRKO, decidimos desarrollar un modelo IGF1R/IR doble *knockout* específico del BAT (BATIGFIRDKO) con el fin de eliminar esa señalización compensatoria y determinar el papel de la delección de ambos receptores sobre el desarrollo y la funcionalidad del BAT.

De la misma manera que ocurrió en el modelo BATIGFIRKO, el modelo IR/IGF1R DKO no presentó alteraciones en el peso corporal a pesar de los elevados niveles de IGF1 plasmáticos observados. Por el contrario, el modelo FIGIRKO (IR/IGF1R doble *knockout* específico de tejido adiposo blanco y marrón) presentó una reducción del peso

corporal que alcanzó el 42% en animales de 12 meses. Dicha reducción de peso fue asociada a una atrofia tanto del tejido adiposo blanco como del marrón (Boucher J *et al.*, 2012). En este sentido el modelo BATIGFIRDKO, también presentó una reducción del BAT de un 80% aproximadamente de la misma manera que el modelo MIGIRKO (IR/IGF1R doble *knockout* específico de músculo) presentó una reducción del 60% de la masa muscular (O'Neill RT *et al.*, 2015). Dado que la ausencia del IGF1R en el BAT no afectó al desarrollo del mismo (Viana-Huete V *et al.*, 2016) y la ausencia del IR en el BAT ocasionó una atrofia del tejido con la edad (Guerra C *et al.*, 2001), este hecho parece sugerir que el principal responsable del mantenimiento del peso del BAT fue el receptor de insulina. Con el fin de corroborar esta hipótesis y de-

bido a que la insulina juega un papel esencial en el metabolismo lipídico (Dimitriadis G *et al.*, 2011) decidimos realizar un estudio histológico del BAT. Así el modelo DKO presentó unos adipocitos marrones hipertróficos y se observó un aumento del contenido graso de los mismos. Estos resultados estaban en concordancia tanto con la reducción de la lipólisis *ex vivo* como con la disminución de los niveles proteicos de HSL observada en los ratones DKO. Es conocido que la HSL es la enzima limitante en el proceso de Lipólisis (Kraemer FB y Shen WJ, 2002). Animales *knockout* de HSL mostraron una reducción de la lipólisis basal no asociada con el desarrollo de la obesidad y presentaron adipocitos marrones hipertróficos (Osuga J *et al.*, 2000). Además, la lipólisis inducida por la activación de PKA es medida por la interacción de la Perilipina 1 con la proteína OPA-1 (Pidoux G *et al.*, 2011) que como se describirá posteriormente, se encontró disminuida en los ratones DKO. Todas estas evidencias nos hicieron rechazar la hipótesis de que la ausencia del IR era el principal responsable de la atrofia marrón observada en el modelo BATIGFIRDKO ya que el aumento en el contenido lipídico, la hipertrofia de los adipocitos marrones y la disminución de la lipólisis *ex vivo* apoyaron la importancia de la enzima HSL en nuestro modelo animal.

Como comentamos anteriormente, la producción de calor en respuesta al frío o a un exceso de ingesta ha sido asociada a la activación adrenérgica de la expresión de UCP1 (Reilly SM y Saltiel AR, 2015). Actualmente, es conocido el hecho de que los procesos de dinámica mitocondrial (equilibrio entre procesos de fusión y fisión mitocondrial) constituyen una parte importante en la adaptación de las células a su estatus energético. En condiciones de abundancia de nutrientes, las células tienden a mantener sus mitocondrias en un estado fragmentado y desacopladas (colapsando su potencial de membrana)

mientras que las células expuestas a privación de nutrientes mantienen sus mitocondrias fusionadas y acopladas (favoreciendo el proceso de fosforilación oxidativa) (Liesa M y Shirihai OS, 2013).

Además, recientemente se ha descrito que la dinámica mitocondrial es un regulador fisiológico de los cambios en el gasto energético inducidos tras la estimulación adrenérgica. Así la estimulación adrenérgica del BAT va a inducir la fragmentación de las mitocondrias mediante la fosforilación de la proteína DRP1 y el procesamiento de OPA-1. Esta fragmentación, va a hacer que las mitocondrias sean más sensibles a los ácidos grasos liberados tras el proceso lipolítico, constituyendo así una vía que junto las descritas anteriormente aumentaría la activación de la termogénesis en el BAT (Wikstrom JD *et al.*, 2014).

Cuando el BAT es estimulado, tiende a pasar de un estado de alta a un estado de baja eficiencia bioenergética, siendo la energía obtenida de la oxidación de los nutrientes dirigida principalmente a la producción de calor en lugar de a la síntesis de ATP (Liesa M y Shirihai OS, 2013). Por ello, decidimos estudiar la captación de glucosa radioactiva mediante PET tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. El modelo DKO, mostró una menor captación de glucosa tanto a temperatura ambiente como a 4 °C. Este hecho se correlacionó con la ausencia de señalización de la insulina, ya que esta es la principal responsable de la translocación del transportador de glucosa Glut4 a la membrana. (Huang S y Czech MP, 2007).

Además, el modelo DKO presentó un fallo termogénico severo tanto a los 3 como a los 12 meses de edad. Este fallo termogénico, por una parte, fue asociado a la disminución de los niveles proteicos de UCP1, así como a una disminución de UCP1 en respuesta al frío tanto a nivel proteico como a nivel de ARNm en el BAT de los ratones DKO en com-

paración con los ratones WT. Por otra parte, la contribución de los mecanismos de fisión en respuesta al frío se encontró fuertemente afectada en los animales DKO. Así el BAT de los ratones DKO, presentó una menor fosforilación de la proteína DRP1 tanto en condiciones de termoneutralidad como en respuesta al frío. De manera adicional, en respuesta al frío se observó que mientras que los ratones WT fueron capaces de aumentar los niveles de la isoforma S-OPA-1, isoforma asociada al proceso de fisión (Quirós PM *et al.*, 2015). Por el contrario, los ratones DKO además de poseer bajos niveles de la proteína OPA-1, no presentaron variaciones en los niveles de la isoforma S-OPA-1 en respuesta al frío, confirmando así que los ratones DKO no fueron capaces de fisiónar sus mitocondrias en respuesta al frío.

De manera paralela se evaluaron los niveles de expresión de distintos genes en el BAT en respuesta al frío. Los ratones DKO en respuesta al frío, presentaron un aumento de la expresión *Pgc1a* mucho mayor que los ratones WT. La expresión de *Fgf21* fue casi 30 veces superior a los niveles observados en ratones WT en respuesta al frío o en ratones DKO en condiciones de termoneutralidad. El aumento de la expresión de estos genes, sugiere la presencia de un mecanismo compensatorio ante la ausencia de IGF1R e IR y ante los bajos niveles de UCP1 observados en el BAT de los ratones DKO. Estos resultados, fueron en concordancia con los observados en los ratones *knockout* para UCP1, los cuales en respuesta al frío, presentaron un aumento dramático de la expresión de *Fgf21* en el BAT y de los niveles plasmáticos de FGF21, (Keipert S *et al.*, 2015). Curiosamente, observamos que los ratones DKO presentaron un aumento de la expresión de *Adrb3* en el BAT, tanto en condiciones basales como a termoneutralidad, lo cual puede ser interpretado como un mecanismo compensatorio ante la falta de los receptores de IGF1 e in-

sulina. Por el contrario, en el modelo FIGIR-KO se observaron bajos niveles de expresión de *Adrb3* en el BAT de los ratones DKO en condiciones basales. (Boucher J *et al.*, 2012). Sin embargo, en respuesta al frío, dicha expresión disminuyó significativamente tanto en ratones WT como DKO. De hecho, la disminución de la expresión de *Adrb3* en respuesta al frío tiene como objetivo proteger a la célula de una sobre-señalización ante una estimulación adrenérgica prolongada (Klaus S *et al.*, 1995).

Las alteraciones observadas en el BAT de los ratones DKO, nos llevó a estudiar si la atrofia observada y la hipertrofia de los adipocitos marrones podría afectar al contenido e integridad de las mitocondrias presentes en el tejido. Estudios previos en el modelo BATIR-KO, demostraron que la ausencia del IR en el BAT no afectó ni a la masa ni a la morfología de las mitocondrias (Guillen C *et al.*, 2013). El modelo DKO, presentó un menor número de mitocondrias y además estas presentaron un menor tamaño. La presencia del menor número de mitocondrias, se correlacionó con menores niveles proteicos de PGC1- α , VDAC, así como una menor expresión de *Tfam*. Además, se analizaron los niveles proteicos y de ARNm de *Pgc1a* y los niveles de ARNm de *Tfam* en condiciones de termoneutralidad o tras la exposición al frío. Mientras que los niveles de expresión de *Tfam* no fueron regulados por la exposición al frío, se encontró un aumento en la expresión de *Pgc1a* en respuesta al frío tanto en animales WT como DKO, siendo mucho mayores los niveles observados en los ratones DKO. Sin embargo, los aumentos en los niveles de expresión, no se correlacionaron con aumentos de los niveles proteicos en los animales DKO, pero si se observó una correlación en el caso de los animales WT. Estos resultados indican posibles modificaciones post-transcripcionales que impiden o dificultan la traducción de este ARNm. En este sentido algunos estu-

dios asocian a GSK3 β un papel negativo en la regulación de los niveles de PGC1- α ya que promueve su degradación por el proteasoma (Anderson RM *et al.*, 2008). Así ante la ausencia de señalización de insulina e IGF-1, GSK3 β va a encontrarse activa, pudiendo ser así la responsable de los menores niveles de proteína observados a pesar de su mayor transcripción. Además, por otra parte, la señalización de insulina ejerce un papel esencial en la síntesis proteica (Méndez R *et al.*, 1996) por lo que la ausencia de señalización puede ser la responsable de las diferencias observadas entre los niveles de ARNm y los niveles proteicos de PGC1- α y de UCP1.

Adicionalmente a la disminución del número y del tamaño de las mitocondrias, también observamos una alteración de las crestas mitocondriales en los ratones DKO. La morfología mitocondrial y su ultra-estructura dependen de las proteínas que regulan la fusión y fisión mitocondrial. Se ha descrito, que los oligómeros que contienen isoformas solubles o isoformas unidas a membrana de OPA-1 son importantes en el mantenimiento de las uniones de las crestas mitocondriales durante la apoptosis independientemente del papel de OPA-1 en la fusión mitocondrial (Freezza C *et al.*, 2006). Además, la delección de OPA-1 se ha asociado con una mayor fragmentación mitocondrial, defectos en la morfología de las crestas, reducción en el ensamblaje de los supercomplejos respiratorios y menores niveles de ADN mitocondrial (Cogliati S *et al.*, 2013). Por ello, asociamos las alteraciones en las crestas mitocondriales en los ratones DKO, con los menores niveles de la proteína OPA-1 observados por *Western blot*. Además, se observaron menores niveles de la proteína anti-apoptótica BCL2 en el BAT de los ratones DKO, hecho que puede sugerir una mayor susceptibilidad a la apoptosis asociada a la ausencia de señalización de insulina e IGF1 (Navarro P *et al.*, 1998; Tseng YH *et al.*, 2002).

Los daños observados en las mitocondrias del BAT de los ratones DKO, nos llevó a pensar que, puesto que dichas mitocondrias no se encontraron englobadas en complejos multivesiculares para ser degradadas por vía autofágica en las imágenes de microscopía electrónica analizadas, probablemente los mecanismos de mitofagia podrían estar afectados en los ratones DKO. PINK-1 y PARKINA, son unas de las principales proteínas involucradas en el principal mecanismo de mitofagia. En presencia de mitocondrias dañadas o mitocondrias con menor potencial de membrana, PINK1 se acumula en dichas mitocondrias y media el reclutamiento de PARKINA desde el citosol (Zhang Y *et al.*, 2012). En este proceso, también es clave la presencia de la proteína adaptadora p62 la cual va a facilitar la unión de las mitocondrias a los autofagosomas a través de la proteína LC3B lipidada.

El BAT de los ratones DKO presentó menores niveles de PINK-1, PARKINA y p62, mientras que los niveles de LC3B lipidado no se vieron alterados. Este hecho puede sugerir que la vía mitofágica inducida por PINK1-PARKINA se encuentra afectada. Sin embargo, a la vista de estas evidencias no podemos asegurar que la mitofagia este afectada, ya que existen otras vías alternativas que no han sido estudiadas, como la de BNIP3 y Nix.

Se ha visto que PINK-1 es esencial para una óptima transducción de la señal de IGF1 e insulina a través de Akt (Akundi RS *et al.*, 2012). La delección de PINK1 ha sido asociada con una moderada fragmentación y despolarización de las mitocondrias, un aumento de las especies reactivas de oxígeno y una deficiente síntesis de ATP (Heeman B *et al.*, 2011). Así los reducidos niveles de PINK1 observados en el BAT de los ratones DKO, no solo estarían afectando al proceso mitofágico, sino que la ausencia de esta proteína podría estar afectando también al metabolismo energético de dichas mitocondrias.

Además, se ha descrito que los ratones *knockout* de p62 específicos de tejido adiposo (blanco y marrón), desarrollaron obesidad como consecuencia de un fallo en la termogénesis sin tiriteo. Demostrándose así, que la proteína p62 regula el metabolismo energético mediante el control de la función mitocondrial del tejido adiposo marrón. En este sentido la deficiencia de p62 observada en el BAT de los ratones DKO también se pudo asociar a la severa disfunción termogénica y a las alteraciones de las crestas mitocondriales observadas. Así se ha visto que p62, por una parte, regula la termogénesis mediante la inducción de la expresión de moléculas como *Atf2*, *Creb*, *Pgc1a* y *Dio2* o mediante el aumento de proteínas como CYTC o UCP1 independientemente del desarrollo o diferenciación de los adipocitos marrones. Por otra parte, p62 también ejerce un papel importante en el número y morfología de las crestas mitocondriales, ya que los ratones p62 $-/-$ específicos de tejido adiposo, presentaron un menor número y una disposición alterada de las crestas mitocondriales de los adipocitos marrones (Müller TD *et al.*, 2013).

Con el fin de estudiar en profundidad el proceso mitofágico y debido a la escasa disponibilidad de tejido adiposo marrón en los ratones DKO, decidimos generar líneas celulares de preadipocitos marrones a partir del BAT de animales *Igf1r^{loxP/loxP} Ir^{loxP/loxP}* (células control o WT) y líneas celulares DKO generadas mediante la transducción de las células control con adenovirus que contienen la recombinasa Cre. Tras comprobar la delección de los receptores en las células DKO, se trató de diferenciar ambos tipos celulares, observándose que las células DKO eran incapaces de diferenciar. Este hecho sugirió la importancia de ambos receptores en la diferenciación de los adipocitos marrones, como previamente ya había sido demostrado por otros grupos de investigación (Boucher J *et al.*, 2010a). A continuación, se procedió a la

caracterización de las células para comprobar si existían diferencias entre el modelo animal y las líneas celulares de preadipocitos marrones. Para ello, estudiamos los niveles proteicos de distintas proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial y en el proceso mitofágico.

Al igual que el modelo animal, las células DKO presentaron menores niveles de PINK1. Sin embargo, al contrario de lo observado en los ratones DKO, los preadipocitos marrones DKO presentaron mayores niveles de VDAC y no presentaron alteraciones en los niveles de p62 y LC3B lipidado en comparación con las células WT. Estos resultados sugieren un posible defecto mitofágico debido a la ausencia de PINK1, el cual probablemente este asociado al aumento de la masa mitocondrial indicado por el aumento de VDAC. Además, la presencia de los mismos niveles proteicos de p62 y LC3B lipidado parece estar indicando que la autofagia funciona correctamente en estas células. De manera paralela, las células DKO presentaron un aumento de MFN1, de la isoforma S-OPA-1 y de DRP1, así como un gran aumento de MFN2. La presencia de una mayor cantidad de proteínas de fusión y fisión mitocondrial en las células DKO, se asoció al aumento de la masa mitocondrial observado en las mismas.

Para corroborar que el flujo autofágico funcionaba correctamente, se comprobó que los niveles de la proteína LC3B lipidada se vieron aumentados ligeramente tras la estimulación con el desacoplador CCCP, tanto en las células WT como en las DKO. Además, se observó un aumento algo mayor de los niveles de LC3B lipidado en las células DKO tras estimular con CCCP y bloquear el flujo autofágico con cloroquina. En conjunto, nuestros resultados sugirieron la presencia de un correcto flujo autofágico en ambos tipos celulares.

En este punto, hipotetizamos que probablemente el proceso mitofágico estaba afectado en las células DKO, como consecuencia de los menores niveles de PINK1. Para ello, se estimularon las células con el desacoplador CCCP (estímulo frecuentemente utilizado para inducir mitofagia) o con CCCP+CQ durante 15h o 24h. Transcurrido dicho tiempo, se estudió el aclaramiento mitocondrial en respuesta a ambos estímulos mediante la valoración de la fluorescencia de la proteína de matriz mitocondrial HADHA. Los resultados indicaron que en presencia de CCCP las células WT presentaron una disminución de la fluorescencia a 15h y en mayor medida a las 24h y que además en presencia de CQ se observó una acumulación de las mitocondrias despolarizadas por el CCCP, resultados que demostraron un correcto flujo mitofágico en las células WT. En el caso de las células DKO se observó una ligera disminución de la fluorescencia a 15 y a 24h, lo cual sugirió un posible defecto en el aclaramiento de las mitocondrias despolarizadas. Además, en presencia de CQ, los niveles de fluorescencia de HADHA no se modificaron, sugiriéndose la ausencia de un flujo mitofágico en las células DKO.

De manera adicional, se estudió la colocación de la proteína adaptadora p62 con TOM20 (usado como marcador mitocondrial) tras la inducción de la mitofagia mediante la estimulación con CCCP durante 4h. Los resultados indicaron que las células DKO presentaron una menor colocación de p62 con TOM20 tras la inducción de la mitofagia, en comparación con las células WT. Estos resultados sugirieron, que en las células DKO, las mitocondrias despolarizadas por el CCCP no se eliminaban correctamente, debido a que no fueron debidamente marcadas con la proteína adaptadora p62 para la iniciación del proceso mitofágico.

Todos estos resultados sugirieron que, los receptores de insulina e IGF1 en los pre-

dipocitos marrones, no son esenciales para un correcto flujo autofágico, pero son imprescindibles para que el proceso mitofágico pueda iniciarse adecuadamente. Sin embargo, al igual que ocurrió en el modelo animal DKO, se deberían estudiar otras vías mitofágicas alternativas para poder llegar a concluir sólidamente que la mitofagia está dañada en ausencia del IR y el IGF1R.

Por último, las células generadas fueron utilizadas para estudiar algunos aspectos relativos a la funcionalidad de los preadipocitos marrones en ausencia de ambos receptores. En primer lugar, se realizaron ensayos de respiración mitocondrial mediante el uso del sistema Seahorse®, el cual permite la adición de distintos compuestos para observar las variaciones en la tasa de consumo de oxígeno. Inicialmente, se observó que la respiración basal fue mayor en las células DKO en comparación con las WT. Este hecho sugirió que las células DKO podrían presentar una demanda y una tasa de renovación de ATP mayores. La adición de Oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa) confirmó esta hipótesis y nos indicó que el consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP estaba ligeramente aumentado en las células DKO. Además, las células DKO también presentaron una capacidad respiratoria máxima mayor en respuesta a FCCP (agente desacoplante, desacopla la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP).

En conjunto los resultados sugirieron que las células DKO presentaban una mayor demanda de ATP. Por otra parte, las células DKO presentaron una capacidad respiratoria máxima mayor, lo que indica que estas células presentan una mayor capacidad mitocondrial para oxidar sustratos. Diversos estudios, han sugerido que la capacidad de reserva bioenergética es importante en el ciclo celular (Mitra K *et al.*, 2009) y que, además, está relacionada con la masa mitocondrial (Hill BG

et al., 2012). Estas evidencias nos hicieron suponer que la mayor capacidad respiratoria máxima podría estar asociada a la mayor masa mitocondrial observada en las células DKO.

Estos resultados podrían ser un reflejo de lo que está ocurriendo en el modelo animal DKO, aunque para poder extrapolar los resultados de manera correcta, lo ideal habría sido trabajar con adipocitos diferenciados. Dada la imposibilidad de los preadipocitos DKO para diferenciar, estos resultados suponen la única aproximación válida posible.

De manera paralela, para comprobar si los preadipocitos marrones presentaban alteraciones en la funcionalidad mitocondrial relacionada con su actividad termogénica, llevamos a cabo experimentos en los que tras someter tanto a preadipocitos marrones WT y DKO al cóctel de diferenciación durante 7 días, se estudiaron los cambios en el potencial de membrana inducidos por la estimulación con noradrenalina. Los resultados indicaron que los adipocitos marrones WT diferenciados fueron capaces de inducir la despolarización de sus mitocondrias en respuesta a noradrenalina. En el caso de las células DKO, la noradrenalina fue capaz de despolarizar las mitocondrias de un menor número de células.

En este sentido hay que destacar que en el caso de los adipocitos marrones WT diferenciados la noradrenalina estaría actuando a través de los receptores β_3 adrenérgicos, ya que estos receptores son los predominantes en los adipocitos maduros. Sin embargo, en el caso de los preadipocitos DKO que no fueron capaces de diferenciar, la noradrenalina estaría ejerciendo sus efectos a través de los receptores β_1 adrenérgicos, predominantes en los preadipocitos (Cannon B y Nedergard J, 2004). Además, se ha visto que los adipocitos marrones procedentes de ratones

que tienen delecionados los receptores β_3 adrenérgicos, son completamente funcionales gracias a que los receptores β_1 adrenérgicos median la respuesta a la noradrenalina (Konkar AA *et al.*, 2000). Por ello, estos resultados sugieren que la despolarización observada en los preadipocitos DKO puede deberse a la acción de los receptores β_1 adrenérgicos.

Debido a la severa atrofia observada en el BAT de los ratones DKO, decidimos estudiar la presencia de células *beige* en los compartimentos adiposos inguinal y epididimal. Sorprendentemente, encontramos un aumento del proceso de *beiging* en el compartimento inguinal, así como la presencia de algún adipocito *beige* aislado en el compartimento epididimal de los animales DKO, visualizados mediante inmunohistoquímica de UCP1. Con el fin de corroborar el proceso de *beiging* observado, se analizó la presencia de la proteína UCP1 mediante *Western blot*. Los resultados mostraron una tendencia a presentar mayores niveles de UCP1 en ambos compartimentos en los animales DKO. Estos resultados sugirieron la existencia de un mecanismo compensatorio de marronización, ante la falta de funcionalidad del BAT canónico en los ratones DKO.

Con el fin de dilucidar que posibles señales serían las responsables de este aumento del proceso de *beiging* y puesto que BMP7 está involucrado en la marronización del tejido adiposo mediante la inducción de la expresión de *Ucp1* y la formación de las células *beige* (Boon MR *et al.*, 2013), decidimos analizar los niveles circulantes de BMP7 en condiciones de termoneutralidad y en respuesta al frío. Los resultados mostraron un aumento de los niveles circulantes de BMP7 en los animales DKO en respuesta al frío tanto en comparación con los animales DKO en condiciones de termoneutralidad como con los animales WT. A continuación, con el fin

de comprobar si el BAT era el principal responsable de estos aumentos circulantes observados, se analizaron los niveles proteicos de BMP7 en condiciones de termoneutralidad y en respuesta al frío. Así se observó que mientras que los ratones WT presentaron un aumento de BMP7 en respuesta al frío, los ratones DKO solo aumentaron ligeramente sus niveles de BMP7.

Estos resultados sugieren en primer lugar, que el BMP7 en respuesta al frío podría estar potenciando los efectos de la estimulación adrenérgica sobre el proceso de *beiging* del tejido adiposo (Nedergaard J y Cannon B, 2014). En segundo lugar, la presencia de unos mayores niveles circulantes de BMP7 en ratones DKO en respuesta al frío, no fueron acompañados con aumentos en los niveles proteicos de BMP7 en el BAT, hecho que sugiere que el BAT no es el responsable de los aumentos observados. En relación a esta observación, se ha descrito que el riñón es el órgano donde se sintetiza BMP7 en mayor medida tanto durante la embriogénesis como durante el desarrollo postnatal (Saini S *et al.*, 2015). En tercer lugar, tal y como comentamos anteriormente, el aumento de expresión de *Fgf21* observado en el BAT de los ratones DKO en respuesta al frío, pueden traducirse en aumentos de FGF21 circulantes, lo cual promovería el proceso de *beiging* del tejido adiposo inguinal.

De manera paralela al estudio de los niveles de BMP7 como posible factor inductor del *beiging*, también se analizaron los niveles de hormonas tiroideas circulantes. En este sentido, en primer lugar, analizamos la expresión de *Dio2* en el BAT de ratones WT y DKO en condiciones de termoneutralidad o tras exposición al frío. Los resultados indicaron un aumento de la expresión de *Dio2* en respuesta al frío tanto en ratones WT como DKO, además los ratones DKO en condiciones de termoneutralidad presentaron una

mayor expresión de *Dio2* en comparación con sus controles. Tras analizar los niveles circulantes de T3, se observó que la mayor expresión de *Dio2* en el BAT de los ratones DKO en condiciones de termoneutralidad o en los ratones WT en respuesta al frío, se correlacionó con aumentos de T3 circulantes. Estos resultados pueden correlacionarse con el mayor *beiging* observado en ratones DKO, el cual podría estar asociado a los mayores niveles de T3. Sin embargo, el aumento de la expresión de *Dio2* observado en los ratones DKO en respuesta al frío, no se correlacionó con alteraciones en los niveles circulantes de T3. Este hecho, nos sugirió que en respuesta al frío, aunque los animales DKO presentan mayores niveles de *Dio2* en el BAT, este tejido no es el responsable de la producción de T3.

La estimulación del BAT por el sistema nervioso simpático en respuesta al frío, aumenta la expresión de *Dio2* en 1-2h (Silva JE y Larsen PR, 1983). Estudios con adipocitos marrones han confirmado que la inducción de *Dio2* por la NA depende de los receptores α_1 y β_{1-3} adrenérgicos, los cuales actúan de manera sinérgica (Raasmaja A y Larsen PR, 1989; Obregon MJ *et al.*, 1987). Puesto que los ratones DKO presentaron mayores niveles de *Adrb3*, estos resultados sugieren que la inducción de *Dio2* en respuesta al frío por la estimulación adrenérgica tiene lugar de manera correcta. Pero probablemente esta enzima no funciona correctamente en los ratones DKO en respuesta al frío, por mecanismos que deben de ser estudiados en profundidad en sucesivos trabajos. Otra posibilidad, es que, en respuesta al frío, aunque el BAT de los ratones DKO sea capaz de producir T3, la producción de T3 que puede estar teniendo lugar en otros tejidos pueda estar afectada.

Por último, se debe tener en cuenta que existen múltiples factores capaces de inducir el proceso de *beiging* los cuales no han sido

analizados en esta tesis (péptidos natriuréticos, sales biliares, BMP8b o Irisina) (Kajimura S *et al.*, 2015), pudiendo ser estos los responsables del aumento del *beiging* observado en el compartimento inguinal de los ratones DKO.

La severa disfunción termogénica observada en los ratones DKO, nos hizo suponer que estos ratones presentarían una mayor susceptibilidad a la obesidad. Tal y como era esperado, se observó un aumento de la masa grasa en los ratones DKO en comparación con los ratones WT. Además, el aumento de masa grasa se correspondió con una redistribución de la grasa entre los distintos compartimentos grasos, observándose un aumento del peso de los depósitos grasos viscerales y una disminución de los depósitos grasos subcutáneos. El exceso de adiposidad visceral relacionado con la obesidad está fuertemente asociado con la resistencia a la insulina, hipertensión, dislipidemia y a un estado de inflamación crónica (Ouchi N *et al.*, 2011). Este estado de inflamación crónica, es comúnmente asociado a un aumento de los niveles de TNF- α y de leptina, así como a una disminución de los niveles de adiponectina. En el caso de los ratones DKO, no se observaron alteraciones en ninguna de estas adipocinas. Estos resultados sugirieron que, aunque estos animales presentaron una cierta tendencia a la obesidad, dicha obesidad no estaba asociada a un estado inflamatorio.

La redistribución lipídica observada en los animales DKO fue asociada a un aumento de los niveles de triglicéridos circulantes. Además, este aumento de triglicéridos también puede ser asociado a la disfunción observada en el BAT, ya que se ha demostrado que el aumento de la actividad del BAT en respuesta al frío controla el aclaramiento de los triglicéridos (Bartelt A *et al.*, 2011).

Ya que tanto el modelo BATIGFIRKO como el modelo BATIRKO, presentaron alteraciones en la homeostasis glucídica (Viana-Huete V *et al.*, 2016; Guerra C *et al.*, 2001), decidimos analizar si la ausencia de ambos receptores también ocasionó alguna alteración en la misma. Los resultados demostraron una resistencia a la insulina en animales DKO a los 3 y a los 12 meses, la cual fue acompañada de una hiperinsulinemia sin afectación en la tolerancia a la glucosa. Esta resistencia a la insulina fue asociada una tendencia a la resistencia a la insulina en hígado, corazón y rWAT a los 3 meses. De manera similar a lo observado en el modelo BATIGFIRKO, probablemente dicha resistencia a la insulina en tejidos periféricos se consolide a los 12 meses.

A la vista de la tendencia a la obesidad de los animales DKO alimentados con dieta estándar asociada a la severa disfunción termogénica, nos propusimos suministrar una dieta rica en grasas saturadas durante 8 semanas con el fin de estudiar cómo podría afectar a la redistribución del órgano adiposo, a la fisiología mitocondrial y al estatus metabólico.

Los animales DKO alimentados con dieta grasa, presentaron un aumento de peso corporal no asociado a cambios en la ingesta. Dicho aumento de masa corporal fue asociado a un aumento de la masa grasa, así como a una redistribución de la grasa hacia compartimentos viscerales a niveles mucho más elevados a lo observado en los animales DKO alimentados con dieta estándar. El BAT de los ratones DKO presentó una elevada infiltración grasa, la cual podría estar agravando la disfunción termogénica observada en los animales DKO alimentados con dieta estándar. Probablemente, la severa atrofia del tejido adiposo marrón y la consiguiente disfunción termogénica, fueron las responsables del gran aumento de los niveles circulantes de IGF1 como mecanismo compensatorio.

En relación al desarrollo de un estado inflamatorio crónico asociado a la obesidad, la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo de los ratones obesos va a ser la responsable de los aumentos de TNF- α asociados al desarrollo de resistencia a la insulina (Brestoff JR y Artis D, 2015). En los ratones DKO alimentados con dieta grasa no se observaron cambios en los niveles circulantes de TNF- α y aunque se observó un aumento de los niveles de leptina y adiponectina, dicho aumento estuvo asociado a la dieta grasa y no al genotipo de los ratones. Además, el aumento de masa grasa y la redistribución del órgano adiposo, estuvo asociada a un aumento de los triglicéridos circulantes, a una resistencia a la insulina y a una severa hiperinsulinemia en los animales DKO.

Estos resultados sugieren que la dieta grasa fue capaz de transformar la susceptibilidad a la adiposidad observada en los ratones DKO alimentados con dieta estándar en una manifiesta obesidad, debido a un posible agravamiento de la disfunción termogénica del BAT en los ratones DKO.

Es conocido que las células expuestas a un ambiente rico en nutrientes tienden a mantener sus mitocondrias en un estado fragmentado mientras que las células expuestas a privación de nutrientes mantienen sus mitocondrias fusionadas durante más tiempo (Liesa M y Shirihai OS, 2013). Con el fin de estudiar el papel de los receptores de IGF1 e insulina en los procesos de dinámica mitocondrial en presencia de un exceso de nutrientes, decidimos analizar los niveles de las proteínas p-DRP1, DRP1 y OPA-1 mediante *Western blot* en el BAT de los ratones alimentados con dieta grasa. Los resultados mostraron una menor fosforilación de DRP1 acompañado de un ligero aumento de los niveles totales de la proteína en los ratones DKO alimentados con dieta grasa. Además, los ratones DKO presentaron menores nive-

les de OPA-1 en comparación con los ratones WT, estos presentaron un ligero aumento de la isoforma S-OPA-1, principalmente relacionada con la fisión mitocondrial (Quirós PM *et al.*, 2015). En conjunto estos resultados sugieren la importancia de los receptores de IGF1 e insulina para un correcto mantenimiento de los procesos de dinámica mitocondrial en respuesta a un ambiente rico en nutrientes.

En resumen, el modelo BATIGFIRDKO (Figura 5.2) ha demostrado que los receptores de IGF1 e insulina son esenciales para el desarrollo y funcionalidad del BAT, para el correcto mantenimiento de la homeostasis glucídica, así como para mantener los procesos de dinámica y control de calidad mitocondrial asociados a la termogénesis. Además, se ha podido comprobar que la ausencia de esta señalización ocasiona el desarrollo de mecanismos compensatorios como los llevados a cabo por IGF1, T3 o FGF21. La severa atrofia del tejido adiposo marrón y la consiguiente disfunción de la termogénesis adaptativa indujeron una franca susceptibilidad a la obesidad asociada al aumento de la masa grasa corporal y a una resistencia a la insulina. Tras suministrar una dieta rica en grasas saturadas, dicha susceptibilidad dio lugar a una manifiesta obesidad asociada al aumento del peso corporal, de la masa grasa corporal, de los triglicéridos circulantes y a la aparición de una resistencia a la insulina sistémica.

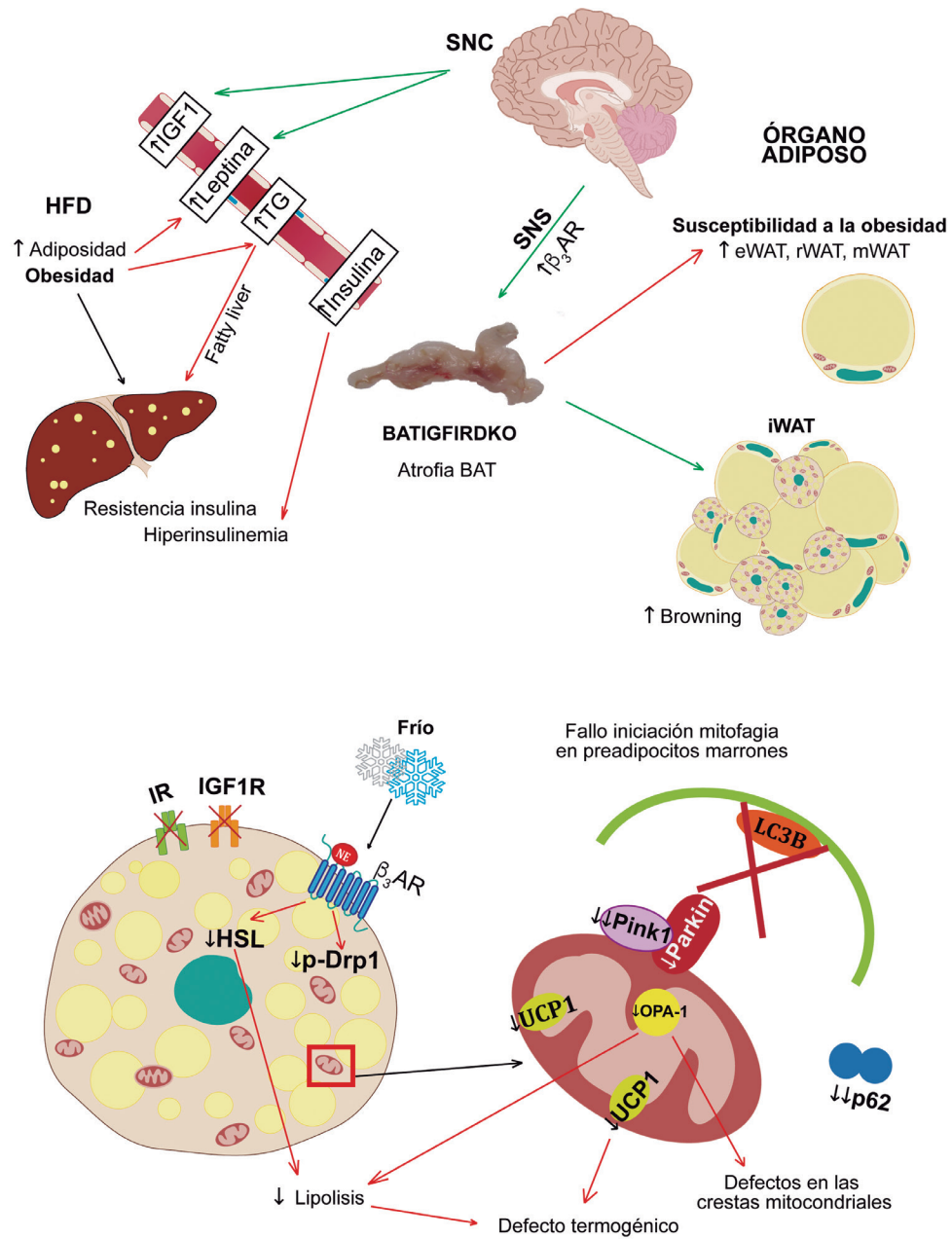


Figura 5.2. Esquema resumen del fenotipo primario y secundario observado en los ratones BATIGFIRDKO.

CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. El IGF1R no es esencial para el desarrollo del tejido adiposo marrón en presencia de la señalización de insulina y elevados niveles de IGF1 circulantes.
2. La presencia de IGF1R en el BAT juega un papel importante en el mantenimiento de la termogénesis y en la marronización del tejido adiposo inguinal.
3. La moderada disfunción termogénica observada en el modelo animal BATIGFIRKO, es suficiente para ocasionar una redistribución del órgano adiposo que va a facilitar el depósito ectópico de lípidos.
4. La ausencia de IGF1R en el BAT, es capaz de ocasionar alteraciones en la homeostasis glucídica y regular los niveles de proteínas desacoplates en los tejidos periféricos.
5. El aumento de UCP3 en el músculo cardíaco del modelo animal BATIGFIRKO ejerce un papel protector frente a la resistencia a la insulina inducida por la dieta grasa no obesogénica.
6. Los receptores de IGF1 e insulina son imprescindibles para el desarrollo y la funcionalidad del tejido adiposo marrón. Su ausencia, se asocia con el aumento compensatorio de la marronización del tejido adiposo inguinal.
7. La severa disfunción termogénica observada en el modelo animal DKO es asociada a una menor cantidad y actividad de la proteína UCP1, así como a un fracaso de la fisión mitocondrial en respuesta al frío.
8. La ausencia de IGF1R e IR en el BAT, se asocia a alteraciones en el número, tamaño y morfología de las mitocondrias, las cuales no van a poder ser correctamente eliminadas debido a un defecto en la iniciación de la mitofagia mediada por p62.
9. La delección de IGF1R e IR en el BAT, es capaz de ocasionar alteraciones en la homeostasis glucídica y está asociada a una mayor susceptibilidad a la obesidad, la cual tras la dieta grasa dio lugar a una manifiesta obesidad.

CONCLUSIÓN FINAL

Los receptores de IGF1 e insulina son esenciales para el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón, jugando un papel fundamental en la mitocondriogénesis, en el control de calidad mitocondrial y en los procesos de dinámica mitocondrial requeridos para la activación del tejido adiposo marrón en respuesta al frío.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM and Smith RJ. Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *J Biol Chem*. 1992 May 25;267(15):10759-63.
- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI and Westphal H. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*. 1996 Jan;12(1):106-9.
- Akundi RS, Zhi L and Büeler H. PINK1 enhances insulin-like growth factor-1-dependent Akt signaling and protection against apoptosis. *Neurobiol Dis*. 2012 Jan;45(1):469-78.
- Algire C, Medrikova D and Herzig S. White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1831(5):896-904.
- Albrecht E, Norheim F, Thiede B, Holen T, Ohashi T, Schering L, Lee S, Brenmoehl J, Thomas S, Drevon CA, Erickson HP and Maak S. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. *Sci Rep*. 2015 Mar 9; 5: 8889.
- Alvarez-Crespo M, Csikasz RI, Martínez-Sánchez N, Diéguez C, Cannon B, Nedergaard J and López M. Essential role of UCP 1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab*. 2016 Feb 10;5(4):271-82.
- Abremski K and Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem*. 1984 Feb 10;259(3):1509-14.
- Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, *et al*. Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell*. 2008;7(1):101-111.
- Andrade JM, Frade AC, Guimarães JB, Freitas KM, Lopes MT, Guimarães AL, de Paula AM, Coimbra CC and Santos SH. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr*. 2014 Oct;53(7):1503-10.
- Annenkov A. The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signaling network regulating neurogenesis. *Mol Neurobiol*. 2009 Aug; 40:195-215.
- Arias E and Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol*. 2011 Apr;23(2):184-9.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura

I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T and Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 2;257(1):79-83.

Ashrafi G and Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*. 2013 Jan; 20(1): 31-42.

Azzu V, Jastroch M, Divakaruni AS and Brand MD. The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun-Jul;1797(6-7):785-91.

B

Barbatelli G, Morroni M, Vinesi P, Cinti S and Michetti F. S-100 protein in rat brown adipose tissue under different functional conditions: a morphological, immunocytochemical, and immunochemical study. *Exp Cell Res*. 1993 Sep;208(1):226-31.

Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R and Cinti S. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Jun;298(6): E1244-53.

Barclay JL, Agada H, Jang C, Ward M, Wetzig N and Ho KK. Effects of glucocorticoids on human brown adipocytes. *J Endocrinol*. 2015 Feb;224(2):139-47. doi: 10.1530/JOE-14-0538. Epub 2014 Nov 10.

Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gortds PL, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M and Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):200-5.

Bartolomé A. Papel de TSC2/mTORC1 en proliferación, autofagia y estrés de retículo endoplasmático en célula β pancreática. 2012. Universidad Complutense de Madrid. Tesis doctoral.

Basith S, Cui M, Hong S and Choi S. Harnessing the Therapeutic Potential of Capsaicin and Its Analogues in Pain and Other Diseases. *Molecules*. 2016 Jul 23;21(8).

Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sclacca L and Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 2009 Oct;30(6):586-623.

Beneit N1, Fernández-García C, Martín-Ventura JL, Perdomo L, Escribano O, Michel J, García-Gómez G, Fernández S, Díaz-Castroverde S, Egido J, Gómez-Hernández A and Benito M. Expression of insulin receptor (IR) A and B isoforms, IGF-IR, and IR/IGF-IR hybrid receptors in vascular smooth muscle cells and their role in cell migration in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol*. 2016 Dec 1;15(1):161.

Benito M, Porras A and Santos E. Establishment of permanent brown adipocyte cell lines achieved by transfection with SV40 large T antigen and ras genes. *Exp Cell Res*. 1993 Dec;209(2):248-54.

Bezaire V, Spriet LL, Campbell S, Sabet N, Gerrits M, Bonen A and Harper ME. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J*. 2005 Jun;19(8):977-9.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ and Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. 2002 Feb;23(1):38-89.

Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB and Kahn CR. Adipose tissue selective insulin receptor *knockout* protects

against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell*. 2002 Jul;3(1):25-38.

Blüher M and Mantzoros CS. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*. 2015 Jan;64(1):131-45.

Bonet ML, Oliver P and Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1831(5):969-85.

Boon MR, van der Horst G, van der Pluijm G, Tamsma JT, Smit JW and Rensen PC. Bone morphogenetic protein 7: a broad-spectrum growth factor with multiple target therapeutic potency. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011 Aug;22(4):221-9.

Boon MR, van den Berg SA, Wang Y, van den Bossche J, Karkampouna S, Bauwens M, De Saint-Hubert M, van der Horst G, Vukicevic S, de Winther MP, Havekes LM, Jukema JW, Tamsma JT, van der Pluijm G, van Dijk KW and Rensen PC. BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS One*. 2013 Sep 16;8(9):e74083.

Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R and Collins S. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest*. 2012 Mar;122(3):1022-36.

Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP and Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7382):463-8.

Boucher J, Tseng YH and Kahn CR. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription. *J Biol Chem*. 2010a May 28;285(22):17235-45.

Boucher J, Macotela Y, Bezy O, Mori MA, Kriauciunas K and Kahn CR. A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal*. 2010b Dec 7;3(151):ra87.

Boucher J, Mori MA, Lee KY, Smyth G, Liew CW, Macotela Y, Rourk M, Blüher M, Russell SJ and Kahn CR. Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun*. 2012; 3: 902.

Boucher J, Kleinridders A and Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Jan 1;6(1). pii: a009191.

Boucher J, Softic S, El Ouaamari A, Krummich MT, Kleinridders A, Kulkarni RN, O'Neill BT and Kahn CR. Differential roles of insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function. *Diabetes*. 2016 Aug;65(8):2201-13.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brestoff JR and Artis D. Immune regulation of metabolic homeostasis in health and disease. *Cell*. 2015 Mar 26; 161(1):146-160.

Broeders EP, Nascimento EB, Havekes B, Brans B, Roumans KH, Tailleux A, Schaart G, Kouach M, Charton J, Deprez B, Bouvy ND, Mottaghy F, Staels B, van Marken Lichtenbelt WD and Schrauwen P. The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity. *Cell Metab*. 2015

Sep 1;22(3):418-26.

Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ and Kahn CR. A muscle-specific insulin receptor *knockout* exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*. 1998 Nov;2(5):559-69.

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D and Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 2000 Sep 22;289(5487):2122-5.

Busiello RA, Savarese S and Lombardi A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol*. 2015 Feb 10;6:36.

C

Calderon-Dominguez M, Mir JF, Fucho R, Weber M, Serra D and Herrero L. Fatty acid metabolism and the basis of brown adipose tissue function. *Adipocyte*. 2015 Dec 10;5(2):98-118.

Calderon-Dominguez M, Sebastián D, Fucho R, Weber M, Mir JF, García-Casarrubios E, Obregón MJ, Zorzano A, Valverde ÁM, Serra D and Herrero L. Carnitine Palmitoyl-transferase 1 Increases Lipolysis, UCP1 Protein Expression and Mitochondrial Activity in Brown Adipocytes. *PLoS One*. 2016 Jul 20;11(7):e0159399.

Cannon B and Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):277-359.

Cao H, Sekiya M, Ertunc ME, Burak MF, Mayers JR, White A, Inouye K, Rickey LM, Erkal BC, Furuhashi M, Tuncman G and Hotamisligil GS. Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):768-78.

Cavalera M, Axling U, Berger K and Holm C.

Rose hip supplementation increases energy expenditure and induces browning of white adipose tissue. *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Dec 6; 13:91.

Chevalier C, Stojanović O, Colin DJ, Suarez-Zamorano N, Tarallo V, Veyrat-Durebex C, Rigo D, Fabbiano S, Stevanović A, Hagemann S, Montet X, Seimbille Y, Zamboni N, Hapfelmeier S and Trajkovski M. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell*. 2015 Dec 3;163(6):1360-74.

Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M and Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 15;14(20):6364-70.

Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.

Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Jul;73(1):9-15.

Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD and Abuin A. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. *Nature*. 2000 Jul 27;406(6794):415-8.

Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, Cipolat S, Costa V, Casarin A, Gomes LC, Perales-Clemente E, Salviati L, Fernandez-Silva P, Enriquez JA and Scorrano L. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell*. 2013 Sep 26;155(1):160-71.

Cohick WS and Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*. 1993;55: 131-53.

Cole MA, Murray AJ, Cochlin LE, Heather LC, McAleese S, Knight NS, Sutton E, Jamil AA, Parrassol N and Clarke K. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. *Basic Res Cardiol*. 2011 May;106(3):447-57.

Cook A and Cowan C. *Adipose*. StemBook. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. 2009 Mar 31. doi: 10.3824/stembook.1.40.1

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM and Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1509-17.

Cypess AM, Zhang H, Schulz TJ, Huang TL, Espinoza DO, Kristiansen K, Unterman TG and Tseng YH. Insulin/IGF-I regulation of necdin and brown adipocyte differentiation via CREB- and FoxO1-associated pathways. *Endocrinology*. 2011 Oct;152(10):3680-9.

Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Franquet Elía E, Kessler SH, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A, Kolodny GM. Activation of human brown adipose tissue by a β 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab*. 2015 Jan 6;21(1):33-8.

D

Daquinag AC, Tseng C, Salameh A, Zhang Y, Amaya-Manzanares F, Dadbin A, Florez F, Xu Y, Tong Q and Kolonin MG. Depletion of white adipocyte progenitors induces *beige* adipocyte differentiation and suppresses obesity development. *Cell Death Differ*. 2015 Feb;22(2):351-63.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):231-41.

de Ligt M, Timmers S and Schrauwen P. Resveratrol and obesity: Can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jun;1852(6):1137-44.

DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E and Livingston DM. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*. 1988 Jul 15;54(2):275-83.

Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ and Forbes BE. The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res*. 2003 Nov-Dec;35(11-12):778-85.

Desbois-Mouthon C, Wendum D, Cadoret A, Rey C, Leneuve P, Blaise A, Housset C, Tronche F, Le Bouc Y and Holzenberger M. Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with liver-specific IGF-1R *knockout*. *FASEB J*. 2006 Apr;20(6):773-5. Epub 2006 Feb 16.

Diano S and Horvath TL. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol Med*. 2012 Jan;18(1):52-8.

Diaz-Castroverde S, Baos S, Luque M, Di Scala M, González-Aseguinolaza G, Gómez-Hernández A, Beneit N, Escribano O and Benito M. Prevalent role of the insulin receptor isoform A in the regulation of hepatic glycogen metabolism in hepatocytes and in mice. *Diabetologia*. 2016 Dec;59(12):2702-2710. Epub 2016 Sep 7.

Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E and Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S52-9.

Ding WX and Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*. 2012 Jul; 393(7): 547-564.

E

Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilá L, Tafuro S, Muñoz S, Roca C, Ramos D, Pujol A, Riu E, Ruberte J and Bosch F. Adipose tissue overexpression of vascular endothelial growth factor protects against diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1801-13.

Entingh-Pearsall A and Kahn CR. Differential roles of the insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptors in response to insulin and IGF-I. *J Biol Chem*. 2004 Sep 3;279(36):38016-24.

F

Fasshauer M, Klein J, Ueki K, Kriauciunas KM, Benito M, White MF and Kahn CR. Essential role of insulin receptor substrate-2 in insulin stimulation of Glut4 translocation and glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25494-501.

Fasshauer M, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M and Kahn CR. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol*. 2001 Jan;21(1):319-29.

Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N and Walsh K. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. *Circulation research*. 2016 May 27;118(11):1786-807.

Forte V, Pandey A, Abdelmessih R, Forte G, Whaley-Connell A, Sowers JR and McFarlane SI. Obesity, Diabetes, the Cardiorenal Syndrome, and Risk for Cancer. *Cardiorenal Med*. 2012 May;2(2):143-162.

Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Minneo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A and Vigneri R. Insulin Receptor Isoform A, a Newly Recognized, High-Affinity Insulin-Like Growth Factor II Receptor in Fetal and

Cancer Cells. *Mol Cell Biol*. 1999 May; 19(5): 3278-3288.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B and Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):177-89.

Frontini A and Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab*. 2010 Apr 7;11(4):253-6.

G

Gallagher EJ and LeRoith D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol Rev*. 2015 Jul;95(3):727-48.

Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM and Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J*. 2015 Apr 1; 34(7): 856-880.

Gilmour RS, Prosser CG, Fleet IR, Cocco L, Saunders JC, Brown KD and Corps AN. From animal to molecule: aspects of the biology of insulin-like growth factors. *Br J Cancer Suppl*. 1988 Dec; 9: 23-30.

Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G and Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014 Apr 10;170(5): R159-71.

Gjoerup O, Chao H, DeCaprio JA and Roberts TM. pRB-dependent, J domain-independent function of simian virus 40 large T antigen in

override of p53 growth suppression. *J Virol*. 2000 Jan;74(2):864-74.

Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escribano O, Cachoeiro V, Lahera V, Benito M. Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology*. 2012 Mar;153(3):1242-55.

Gómez-Hernández A, Perdomo L, de las Heras N, Beneit N, Escribano O, Otero YF, Guillén C, Díaz-Castroverde S, Gozalbo-López B, Cachoeiro V, Lahera V and Benito M. Antagonistic effect of TNF- α and insulin on uncoupling protein 2 (UCP-2) expression and vascular damage. *Cardiovasc Diabetol*. 2014 Jul 31;13:108.

Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Brüning J, Kozak LP, Kahn CR and Benito M. Brown adipose tissue-specific insulin receptor *knockout* shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1205-13.

H

Hall KD, Heymsfield SB, Kemnitz JW, Klein S, Schoeller DA and Speakman JR. Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *Am J Clin Nutr*. 2012; 95:989-94.

Harms M and Seale P. Brown and *beige* fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1252-63.

Harper ME and Himms-Hagen J. Mitochondrial efficiency: lessons learned from transgenic mice. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Mar 1;1504(1):159-72.

Heeman B, Van den Haute C, Aelvoet SA, Valsecchi F, Rodenburg RJ, Reumers V, Debyser Z, Callewaert G, Koopman WJ, Willems PH and Baekelandt V. Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeos-

tasis and energy maintenance. *J Cell Sci*. 2011 Apr 1;124(Pt 7):1115-25.

Hernández A and Obregón MJ. Presence and mRNA expression of T3 receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 1996 Jul 23;121(1):37-46.

Hill AA, Reid Bolus W and Hasty AH. A decade of progress in adipose tissue macrophage biology. *Immunol Rev*. 2014 Nov;262(1):134-52.

Hill BG, Benavides GA, Lancaster JR Jr, Ballinger S, Dell'Italia L, Jianhua Z and Darley-Usmar VM. Integration of cellular bioenergetics with mitochondrial quality control and autophagy. *Biol Chem*. 2012 Dec;393(12):1485-1512.

Hill JO, Wyatt HR and Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012 Jul 3;126(1):126-32.

Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G and Cinti S. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Sep;279(3):C670-81.

Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T and Villarroya F. Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15;286(15):12983-90.

Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.

Hruby A, Manson JE, Qi L, Malik VS, Rimm EB, Sun Q, Willett WC and Hu FB

Determinants and consequences of obesity. *American Journal of Public Health*. 2016 Sep;106(9):1656-62.

Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech*. 2009

May-Jun; 2(5-6): 231–237.

Huang S and Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 2007 Apr;5(4):237–52.

Hüttemann M, Helling S, Sanderson TH, *et al.* Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012;1817(4):598–609.

I

Iida S, Chen W, Nakadai T, Ohkuma Y and Roeder RG. PRDM16 enhances nuclear receptor-dependent transcription of the brown fat-specific Ucp1 gene through interactions with Mediator subunit MED1. *Genes Dev.* 2015 Feb 1;29(3):308–21.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J and Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):648–57.

J

Jiménez-Aranda A, Fernández-Vázquez G, Campos D, Tassi M, Velasco-Perez L, Tan DX, Reiter RJ and Agil A. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. *J Pineal Res.* 2013 Nov;55(4):416–23.

Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, Gerber KK, Szpyt J, Robinson MM, Nair KS, Gygi SP and Spiegelman BM. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):734–40.

K

Kahn BB and Flier JS. Obesity and insulin re-

sistance. *J Clin Invest.* 2000 Aug;106(4):473–81.

Kajimura S, Spiegelman BM and Seale P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):546–59.

Kanamaru Y, Sekine S, Ichijo H and Takeda K. The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses. *J Signal Transduct.* 2012; 2012: 931215.

Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA and Panagiotakos DB. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Mar 15;57(11):1299–313.

Keipert S, Kutschke M, Lamp D, Brachthäuser L, Neff F, Meyer CW, Oelkrug R, Kharitonkov A and Jastroch M. Genetic disruption of uncoupling protein 1 in mice renders brown adipose tissue a significant source of FGF21 secretion. *Mol Metab.* 2015 May 14;4(7):537–42.

Kim JJ and Accili D. Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm IGF Res.* 2002 Apr;12(2):84–90.

King GL, Park K and Li Q. Selective Insulin Resistance and the Development of Cardiovascular Diseases in Diabetes: The 2015 Edwin Bierman Award Lecture. *Diabetes.* 2016 Jun;65(6):1462–71.

Klaus S, Muzzin P, Revelli JP, Cawthorne MA, Giacobino JP and Ricquier D. Control of beta 3-adrenergic receptor gene expression in brown adipocytes in culture. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 Apr 1;109(2):189–95.

Klötting N, Koch L, Wunderlich T, Kern M, Ruschke K, Krone W, Brüning JC, Blüher M. Autocrine IGF-1 action in adipocytes controls systemic IGF-1 concentrations and growth.

Diabetes. 2008 Aug;57(8):2074-82.

Konkar AA1, Zhai Y and Granneman JG. beta1-adrenergic receptors mediate beta3-adrenergic-independent effects of CGP 12177 in brown adipose tissue. *Mol Pharmacol*. 2000 Feb;57(2):252-8.

Kraemer FB and Shen WJ. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di)-acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res*. 2002 Oct;43(10):1585-94.

Krishnan J, Danzer C, Simka T, Ukropec J, Walter KM, Kumpf S, Mirtschink P, Ukropcova B, Gasperikova D, Pedrazzini T and Krek W. Dietary obesity-associated Hif1 α activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):259-70.

Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L and Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest*. 1983 Sep;72(3):1150-62.

Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA and Kahn CR. Tissue-specific *knockout* of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999 Feb 5;96(3):329-39.

Kulkarni RN, Holzenberger M, Shih DQ, Ozcan U, Stoffel M, Magnuson MA and Kahn CR. beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet*. 2002 May;31(1):111-5. Epub 2002 Apr 1.

Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH and Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis*. 2009 Dec;14(12):1484-95.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lafontan M and Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*. 2009 Sep;48(5):275-97.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P and Auwerx J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*. 2006 Dec 15;127(6):1109-22.

Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, Entingh-Pearshall A, Holzenberger M, Liao R and Kahn CR. Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol Cell Biol*. 2007 Mar;27(5):1649-64.

Lavallard VJ, Meijer AJ, Codogno P and Gual P. Autophagy, signaling and obesity. *Pharmacol Res*. 2012 Dec;66(6):513-25.

Lee FY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin HZ, Trush M and Diehl AM. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology*. 1999 Mar;29(3):677-87.

Leto D and Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 May 23;13(6):383-96.

Lidell ME, Betz MJ and Enerbäck S. Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *J Intern Med*. 2014 Oct;276(4):364-77.

Liesa M y Shirihaï OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*. 2013 Apr 2;17(4):491-506.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ and

L

Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993 Oct 8;75(1):59-72.

Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. 2001; 25: 402-408.

Lopategi A, López-Vicario C, Alcaraz-Quiles J, García-Alonso V, Rius B, Titos E and Clària J. Role of bioactive lipid mediators in obese adipose tissue inflammation and endocrine dysfunction. *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jan 5; 419: 44-59.

Lopes HF, Corrêa-Giannella ML, Conso-
lim-Colombo FM and Egan BM. Visceral adiposity syndrome. *Diabetol Metab Syndr*. 2016 Jul 19; 8:40.

López IP, Piñeiro-Hermida S, Pais RS, Torrens R, Hoeflich A and Pichel JG. Involvement of Igf1r in bronchiolar epithelial regeneration: role during repair kinetics after selective club cell ablation. *PLoS One*. 2016; 11(11): e0166388.

López M, Varela L, Vázquez MJ, Rodríguez-Cuenca S, González CR, Velagapudi VR, Morgan DA, Schoenmakers E, Agassandian K, Lage R, Martínez de Morentin PB, Tovar S, Nogueiras R, Carling D, Lelliott C, Gallego R, Oresic M, Chatterjee K, Saha AK, Rahmouni K, Diéguez C and Vidal-Puig A. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med*. 2010 Sep;16(9):1001-8.

Low Wang CC, Hess CN, Hiatt WR and Goldfine AB. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus - Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. *Circulation*. 2016 Jun 14;133(24):2459-502.

Lowell BB and Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermo-

genesis. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):652-60.

M

Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer*. 1992 Mar; 65(3): 311-320.

MacLellan JD, Gerrits MF, Gowing A, Smith PJ, Wheeler MB and Harper ME. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes*. 2005 Aug;54(8):2343-50.

Mafort TT, Rufino R, Costa CH and Lopes AJ. Obesity: systemic and pulmonary complications, biochemical abnormalities and impairment of lung function. *Multidiscip Respir Med*. 2016 Jul 12; 11:28.

Manders EM, Stap J, Brakenhoff GJ, van Driel R and Aten JA. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci*. 1992 Nov;103 (Pt 3):857-62.

Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J and Cantley LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell*. 2002 Jul;10(1):151-62.

Marrif H, Schiffman A, Stepanyan Z, Gillis MA, Calderone A, Weiss RE, Samarut J and Silva JE. Temperature homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor-alpha gene products. *Endocrinology*. 2005 Jul;146(7):2872-84.

Martínez-Sánchez N, Alvarez C, Fernø J, Nogueiras R, Diéguez C and López M. Hypothalamic effects of thyroid hormones on metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol*

Metab. 2014 Oct;28(5):703-12.

Massoner P, Ladurner-Rennau M, Eder IE and Klocker H. Insulin-like growth factors and insulin control a multifunctional signalling network of significant importance in cancer. *Br J Cancer*. 2010 Nov 9;103(10):1479-84.

Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K and Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100(20):11285-90.

Mavalli MD, DiGirolamo DJ, Fan Y, Riddle RC, Campbell KS, van Groen T,4 Stuart J. Frank,4,5,6 Mark A. Sperling,2 Karyn A. Esser,3 Marcas M. Bamman,7 and Thomas L. Clemens. Distinct growth hormone receptor signaling modes regulate skeletal muscle development and insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest*. 2010 Nov 1; 120(11): 4007–4020.

McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A and Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1400-12.

McManus EJ, Sakamoto K, Armit, LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R and Alessi DR. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knock-in analysis. *EMBO J*. 2005 Apr 20; 24(8): 1571–1583.

Medvedev LN and Elsukova EI. Can thermogenic adipocytes protect from obesity? *J Physiol Biochem*. 2015 Dec;71(4):847-53.

Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U and Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*. 2013 Jun;8(6):1149-54.

Mèndez R, Myers MG Jr, White MF and Rhoads RE. Stimulation of protein synthesis, eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation, and PHAS-I phosphorylation by insulin requires insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol*. 1996 Jun;16(6):2857-64.

Merlin J, Evans BA, Dehvari N, Sato M, Bengtsson T and Hutchinson DS. Could burning fat start with a brite spark? Pharmacological and nutritional ways to promote thermogenesis. *Mol Nutr Food Res*. 2016 Jan;60(1):18-42.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA and Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*. 2000 Jul;6(1):87-97.

Mishra P and Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*. 2016 Feb 15;212(4):379-87.

Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase.

Moller DE, Yokota A, Caro JF and Flier JS. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol*. 1989 Aug;3(8):1263-9.

Morganstein DL, Wu P, Rosell Mane M, Fisk NM, White R and Parker MG. Human fetal mesenchymal stem cells differentiate into brown and white adipocytes, and reveal a role for ERR α in human UCP1 expression. *Cell Res*. 2010 Apr;20(4):434-44.

Müller TD, Lee SJ, Jastroch M, Kabra D, Stemmer K, Aichler M, Abplanalp B, Ananthakrishnan G, Bhardwaj N, Collins S, Divanovic S, Endelev M, Finan B, Gao Y, Habegger KM, Hembree J, Heppner KM, Hofmann S, Holland J, Küchler D, Kutschke M, Krishna R, Lehti M, Oelkrug R, Ottaway N, Perez-Tilve D, Raver C, Walch AK, Schriever SC, Speakman J, Tseng YH, Diaz-Meco M, Pfluger PT, Moscat J and Tschöp MH. p62 links β -adrenergic input to

mitochondrial function and thermogenesis. *J Clin Invest*. 2013 Jan;123(1):469-78.

Mur C, Valverde AM, Kahn CR and Benito M. Increased insulin sensitivity in IGF-I receptor-deficient brown adipocytes. *Diabetes*. 2002 Mar;51(3):743-54.

Mur C, Arribas M, Benito M and Valverde AM. Essential role of insulin-like growth factor I receptor in insulin-induced fetal brown adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 2003 Feb;144(2):581-93.

N

Nagy G, Koncz A and Perl A. Cell Activation-Induced Mitochondrial Hyperpolarization Is Mediated by Ca²⁺- and Redox-Dependent Production of Nitric Oxide. *J Immunol*. 2003 Nov 15; 171(10): 5188-5197.

Navarro P, Valverde AM, Benito M and Lorenzo M. Insulin/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-kinase and Map Kinase-dependent manner. *Experimental Cell Research*. 1998; 243: 213-221.

Navarro P, Valverde AM, Conejo R, Benito M and Lorenzo M. Inhibition of caspases rescues brown adipocytes from apoptosis downregulating BCL-XS and upregulating BCL-2 gene expression. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 1;246(2):301-7.

Nedergaard J and Cannon B. The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*. 2014 Sep 2;20(3):396-407.

Ng, M *et al*. Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: A systematic analysis. *Lancet*. 2014 Aug; 384(9945):766-781.

O

Oberbauer AM. The regulation of IGF-1 gene transcription and splicing during development and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013 Mar 26;4: 39.

Obregon MJ, Mills I, Silva JE and Larsen PR. Catecholamine stimulation of iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat dispersed brown adipocytes. *Endocrinology*. 1987 Mar;120(3):1069-72.

Obregon MJ. Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid*. 2008 Feb;18(2):185-95.

Obregon MJ. Adipose tissues and thyroid hormones. *Front Physiol*. 2014 Dec; (5):479.

Ock S, Lee WS, Ahn J, Kim HM, Kang H, Kim HS, Jo D, Abel ED, Lee TJ and Kim J. Deletion of IGF-1 Receptors in cardiomyocytes attenuates cardiac aging in male mice. *Endocrinology*. 2016 Jan; 157(1): 336-345.

Oh DY, Morinaga H, Talukdar S, Bae EJ and Olefsky JM. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*. 2012 Feb; 61(2):346-54.

O'Neill BT, Lauritzen HP, Hirshman MF, Smyth G, Goodyear LJ and Kahn CR. Differential Role of Insulin/IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis. *Cell Rep*. 2015 May 26;11(8):1220-35.

Osuga J, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O and Yamada N. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 18;97(2):787-92.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ and Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85-97

Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, Turcotte EE, Richard D and Carpentier AC. Brown adipose tissue

oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest*. 2012 Feb;122(2):545-52.

Owen BM, Mangelsdorf DJ and Kliewer SA. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Jan;26(1):22-9.

P

Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R and Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39684-95.

Perwitz N, Wenzel J, Wagner I, Büning J, Drenckhan M, Zarse K, Ristow M, Lilienthal W, Lehnert H and Klein J. Cannabinoid type 1 receptor blockade induces transdifferentiation towards a brown fat phenotype in white adipocytes. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Feb;12(2):158-66.

Pidoux G, Witczak O, Jarnæss E, Myrvold L, Urlaub H, Stokka AJ, Küntziger T and Taskén K. Optic atrophy 1 is an A-kinase anchoring protein on lipid droplets that mediates adrenergic control of lipolysis. *EMBO J*. 2011 Oct 7;30(21):4371-86.

Popkin BM, Adair LS and Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev*. 2012 Jan; 70 (1): 3-21.

Powell-Braxton L, Hollingshead P, Warburton C, Dowd M, Pitts-Meek S, Dalton D, Gillett N and Stewart TA. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes Dev*. 1993 Dec;7(12B):2609-17.

Puigserver P and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator.

Endocr Rev. 2003 Feb;24(1):78-90.

Q

Quirós PM, Langer T and López-Otín C. New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Jun;16(6):345-59.

R

Rajan S, Gupta A, Beg M, Shankar K, Srivastava A, Varshney S, Kumar D and Gaikwad AN. Adipocyte transdifferentiation and its molecular targets. *Differentiation*. 2014 Jun;87(5):183-92.

Raasmaja A and Larsen PR. Alpha 1- and beta-adrenergic agents cause synergistic stimulation of the iodothyronine deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology*. 1989 Nov;125(5):2502-9.

Reilly SM and Saltiel AR. A futile approach to fighting obesity? *Cell*. 2015 Oct 22;163(3):539-40.

Report of a WHO consultation. Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894: i-xii, 1-253.

Rezaee F and Dashty M. Role of adipose tissue in metabolic system disorders. Adipose tissue is the initiator of metabolic diseases. *J Diabetes Metab*. 2013; S13:008.

Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC and Brent GA. Thyroid hormone-sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform-specific. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108(1):97-105.

Richard D. Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 Aug;11(8):489-501.

Ricquier D and Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J*. 2000 Jan 15;345 Pt 2:161-79.

Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S and Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015 Oct 15;309(8): E691-714.

Roman S, Agil A, Peran M, Alvaro-Galue E, Ruiz-Ojeda FJ, Fernández-Vázquez G and Marchal JA. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res*. 2015 Apr;165(4):464-79.

Rosen ED and Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014 Jan 16; 156: 20-44.

Rosenwald M, Perdikari A, Rülcke T and Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol*. 2013 Jun;15(6):659-67.

Russell WC, Newman C and Williamson DH. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*. 1975 Feb 6;253(5491):461-2.

Rutkowski JM, Stern JH and Scherer PE. The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*. 2015 Mar 2;208(5):501-12.

Ruud J and Brüning JC. Light on leptin link to lipolysis. *Nature*. 2015 Nov 5;527(7576):43-4.

S

Saini S, Duraisamy AJ, Bayen S, Vats P and Singh SB. Role of BMP7 in appetite regulation, adipogenesis, and energy expenditure. *Endocrine*. 2015 Mar;48(2):405-9.

Salmon WD, Jr, Daughaday WH. A hormonal-

ly controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage *in vitro*. *J Lab Clin Med*. 1957; 49: 825-836.

Sanchez-Alavez M, Osborn O, Tabarean IV, Holmberg KH, Eberwine J, Kahn CR and Bartfai T. Insulin-like growth factor 1-mediated hyperthermia involves anterior hypothalamic insulin receptors. *J Biol Chem*. 2011 Apr 29;286(17):14983-90.

Sauer B and Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jul;85(14):5166-70.

Schrauwen P, Mensink M, Schaart G, Moonen-Kornips E, Sels JP, Blaak EE, Russell AP and Hesselink MK. Reduced skeletal muscle uncoupling protein-3 content in prediabetic subjects and type 2 diabetic patients: restoration by rosiglitazone treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr;91(4):1520-5.

Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T, Schrier D, Falb D, Kirkland JL, Wagers AJ and Tseng YH. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 4;108(1):143-8.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Chin S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR and Spiegelman BM. PRDM16 Controls a Brown Fat/Skeletal Muscle Switch. *Nature*. 2008 Aug 21; 454(7207): 961-967.

Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S and Spiegelman BM. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):96-105.

Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B and Nedergaard J. UCP1 in

brite/*beige* adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep.* 2013 Dec 12;5(5):1196-203.

Shinoda K, Luijten IH, Hasegawa Y, Hong H, Sonne SB, Kim M, Xue R, Chondronikola M, Cypess AM, Tseng YH, Nedergaard J, Sidossis LS and Kajimura S. Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat Med.* 2015 Apr;21(4):389-94.

Shirihai O, Song M and Dorn GW. How mitochondrial dynamism orchestrates mitophagy. *Circ Res.* 2015 May 22; 116(11): 1835-1849.

Silva JE and Larsen PR. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature.* 1983 Oct 20-26;305(5936):712-3.

Silvestri E, Moreno M, Lombardi A, Ragni M, de Lange P, Alexson SE, Lanni A and Goglia F. Thyroid-hormone effects on putative biochemical pathways involved in UCP3 activation in rat skeletal muscle mitochondria. *FEBS Lett.* 2005 Mar 14;579(7):1639-45.

Sims EA. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* 2001 Dec;50(12):1499-504.

Spielgeman BM and Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001 Feb 23; 104:531-543.

Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH and Goodyear LJ. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 2013 Jan;123(1):215-23.

Sun K1, Tordjman J, Clément K and Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 2013 Oct 1;18(4):470-7.

Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):85-96.

Tang QQ and Lane MD. Adipogenesis: From Stem Cell to Adipocyte. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81:715-36.

Tchernof A and Després JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):359-404.

Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak EE, Auwerx J and Schrauwen P. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab.* 2011 Nov 2;14(5):612-22.

Townsend KL, Suzuki R, Huang TL, Jing E, Schulz TJ, Lee K, Taniguchi CM, Espinoza DO, McDougall LE, Zhang H, He TC, Kokkotou E and Tseng YH. Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) reverses obesity and regulates appetite through a central mTOR pathway. *FASEB J.* 2012 May;26(5):2187-96.

Townsend KL, An D, Lynes MD, Huang TL, Zhang H, Goodyear LJ and Tseng YH. Increased mitochondrial activity in BMP7-treated brown adipocytes, due to increased CPT1- and CD36-mediated fatty acid uptake. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul 20;19(3):243-57.

Trayhurn P. Recruiting Brown adipose tissue in human obesity. *Diabetes.* 2016 May; 65:1158-1160.

Tseng YH, Ueki K, Kriauciunas KM and Kahn CR. Differential roles of insulin receptor substrates in the anti-apoptotic function of insulin-like growth factor-1 and insulin. *J Biol Chem.* 2002 Aug 30;277(35):31601-11.

Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL,

T

Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN and Kahn CR. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. 2008 Aug 21;454(7207):1000-4.

Tseng YH, Cypess AM and Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Jun;9(6):465-82.

Turer AT and Scherer PE. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications. *Diabetologia*. 2012 Sep;55(9):2319-26.

U

Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, Dahlgren GM, Peters JL, Shackman JG, Zhang M, Artner I, Satin LS, Stein R, Holzenberger M, Kennedy RT, Kahn CR and Kulkarni RN. Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat Genet*. 2006 May;38(5):583-8.

V

Valverde AM, Mur C, Brownlee M and Benito M. Susceptibility to apoptosis in insulin-like growth factor-I receptor-deficient brown adipocytes. *Mol Biol Cell*. 2004 Nov;15(11):5101-17.

Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F and Arner P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*. 1998 Jun;47(6):913-7.

van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P and Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1500-8.

Viana-Huete V, Guillén C, García-Aguilar A, García G, Fernández S, Kahn CR and Beni-

to M. Essential Role of IGFIR in the onset of male brown fat thermogenic function: regulation of glucose homeostasis by differential organ-specific insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2016 Apr;157(4):1495-511.

Viana-Huete V, Guillén C, García G, Fernández S, García-Aguilar A, Kahn CR and Benito M. Brown fat-specific double *knockout* of IGFIR/IR: Atrophy, uncoupling mechanisms failure, impaired thermogenesis and obesity. *Nat Commun*. 2017 (en revision).

Villarroya F and Vidal-Puig A. Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab*. 2013 May 7;17(5):638-43.

Villarroya F, Cereijo R, Villarroya J and Giralt M. Brown adipose tissue as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2017 Jan;13(1):26-35.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerbäck S and Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1518-25.

Virtue S and Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome- An allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1801(3):338-49.

Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999 Dec 8;282(22):2131-5.

Vosselman MJ, van Marken Lichtenbelt WD and Schrauwen P. Energy dissipation in brown adipose tissue: from mice to men. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Oct 15;379(1-2):43-50.

W

Wanders D, Forney LA, Stone KP, Burk DH, Pierse A, Gettys TW. FGF21 Mediates the Thermogenic and Insulin-Sensitizing Effects of Dietary Methionine Restriction but not its

Effects on Hepatic Lipid Metabolism. *Diabetes*. 2017 Jan 17. pii: db161212.

Wang GX, Zhao XY, Meng ZX, Kern M, Dietrich A, Chen Z, Cozacov Z, Zhou D, Okunade AL, Su X, Li S, Blüher M and Lin JD1. The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat Med*. 2014 Dec;20(12):1436-43.

Wang QA, Tao C, Gupta RK and Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1338-44.

Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Zhu M, Rodgers BD, Jiang Q, Dodson MV and Du M. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. *Int J Obes (Lond)*. 2015 Jun;39(6):967-76.

Wang Y, Cheng Z, ElAlieh HZ, Nakamura E, Nguyen MT, Mackem S, Clemens TL, Bikle DD and Chang W. IGF-1R signaling in chondrocytes modulates growth plate development by interacting with the PTHrP/Ihh pathway. *J Bone Miner Res*. 2011 Jul; 26(7): 1437-1446.

Wang YL, Lin SP, Hsieh PC, Hung SC. Concomitant *beige* adipocyte differentiation upon induction of mesenchymal stem cells into brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 16;478(2):689-95.

Wankhade UD, Shen M, Yadav H and Thakali KM. Novel Browning Agents, Mechanisms, and Therapeutic Potentials of Brown Adipose Tissue. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:2365609.

Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC and Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006 Jan 26;439(7075):484-9.

Whittle AJ, Carobbio S, Martins L, Slawik M, Hondares E, Vázquez MJ, Morgan D, Csikasz RI, Gallego R, Rodriguez-Cuenca S, Dale M, Virtue S, Villarroya F, Cannon B, Rahmouni K, López M and Vidal-Puig A. BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*. 2012 May 11;149(4):871-85.

Wikstrom JD, Katzman SM, Mohamed H, Twig G, Graf SA, Heart E, Molina AJ, Corkey BE, de Vargas LM, Danial NN, Collins S and Shirihai OS. beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes*. 2007 Oct;56(10):2569-78.

Wikstrom JD, Mahdaviani K, Liesa M, Sereda SB, Si Y, Las G, Twig G, Petrovic N, Zingaretti C, Graham A, Cinti S, Corkey BE, Cannon B, Nedergaard J and Shirihai OS. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J*. 2014 Mar 3; 33(5): 418-436.

Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P and Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366-76.

X

Y

Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ and James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep*. 2015 Aug 11;12(6):937-43.

Ye R and Scherer PE. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? *Mol Metab*. 2013 Apr 19;2(3):133-41.

Yoneshiro T, Kaede R, Nagaya K, Aoyama J, Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Terao A. Royal jelly ameliorates diet-induced obesity and glucose intolerance by promoting brown adipose tissue thermogenesis in mice. *Obes Res Clin Pract*. 2017 Jan 11. S1871-403X (16):30428-8.

Yen M and Ewald MB. Toxicity of weight loss agents. *J Med Toxicol*. 2012 Jun;8(2):145-52.

Z

Zhang H, Schulz TJ, Espinoza DO, Huang TL, Emanuelli B, Kristiansen K and Tseng YH. Cross talk between insulin and bone morphogenetic protein signaling systems in brown adipogenesis. *Mol Cell Biol*. 2010 Sep;30(17):4224-33.

Zhang Y, Zeng X and Jin S. Autophagy in adipose tissue biology. *Pharmacol Res*. 2012 Dec;66(6):505-12.

Zhang Y, Xie C, Wang H, Foss RM, Clare M, George EV, Li S, Katz A, Cheng H, Ding Y, Tang D, Reeves WH and Yang LJ. Irisin exerts dual effects on browning and adipogenesis of human white adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016 Aug 1;311(2): E530-41.

Zhu Z, Spicer EG, Gavini CK, Goudjo-Ako AJ, Novak CM and Shi H. Enhanced sympathetic activity in mice with brown adipose tissue transplantation (transBATation). *Physiol Behav*. 2014 Feb 10;125: 21-9.

Zorzano A, Liesa M and Palacín M. Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Oct;41(10):1846-54.

ANEXOS

Essential Role of IGFIR in the Onset of Male Brown Fat Thermogenic Function: Regulation of Glucose Homeostasis by Differential Organ-Specific Insulin Sensitivity

Vanesa Viana-Huete, Carlos Guillén, Ana García-Aguilar, Gema García, Silvia Fernández, C. R. Kahn, and Manuel Benito

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy (V.V.-H., C.G., A.G.-A., G.G., S.F., M.B.), Complutense University–Madrid, Madrid 28040, Spain; Spanish Diabetes and Metabolic Research Network (V.V.-H., C.G., A.G.-A., G.G., S.F., M.B.), Institute of Health Carlos III, Madrid 28029, Spain; and Joslin Diabetes Center (C.R.K.), Harvard Medical School, Boston, MA 02215

Brown fat is a thermogenic tissue that generates heat to maintain body temperature in cold environments and dissipate excess energy in response to overfeeding. We have addressed the role of the IGFIR in the brown fat development and function. Mice lacking IGFIR exhibited normal brown adipose tissue/body weight in knockout (KO) vs control mice. However, lack of IGFIR decreased uncoupling protein 1 expression in interscapular brown fat and beige cells in inguinal fat. More importantly, the lack of IGFIR resulted in an impaired cold acclimation. No differences in the total fat volume were found in the KO vs control mice. Epididymal fat showed larger adipocytes but with a lower number of adipocytes in KO vs control mice at age 12 months. In addition, KO mice showed a sustained moderate hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia upon time and hepatic insulin insensitivity associated with lipid accumulation, with the outcome of a global insulin resistance. In addition, we found that the expression of uncoupling protein 3 in the skeletal muscle was decreased and its expression was increased in the heart in parallel with the expression of beta-2 adrenergic receptors. Upon nonobeseogenic high-fat diet, we found a severe insulin resistance in the liver and in the skeletal muscle, but unchanged insulin sensitivity in the heart. In conclusion, our data suggest that IGFIR is not an essential growth factor in the brown fat development in the presence of the IR and very high plasma levels of IGF-I, but it is indispensable for full brown fat functionality. (*Endocrinology* 157: 1495–1511, 2016)

There are two functionally and morphologically different types of adipose tissue in mammals: white adipose tissue (WAT), which is the primary site of triglyceride storage; and brown adipose tissue (BAT), which specializes in energy expenditure. Brown fat is primarily a thermogenic tissue that burns fat to generate heat and help maintain body temperature in cold environments. It also helps dissipate excess energy in response to overfeeding (1). In mammals, adaptive thermogenesis occurs primarily in brown fat and in skeletal muscle. Adaptive thermogenesis

can be divided into three subtypes: 1) shivering thermogenesis, a function of skeletal muscle; 2) nonshivering thermogenesis, a function of brown fat (both in response to cold); 3) and diet-induced thermogenesis, which is also a function of brown fat and induced by overfeeding. Ablation of BAT in rodents by means of toxins or genome manipulation results in obesity (2). Although earlier studies of mice uncoupling protein 1 (UCP-1) ablation failed to demonstrate an obesogenic effect, recently it has been demonstrated that these mice do become obese and dem-

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in USA
Copyright © 2016 by the Endocrine Society
Received July 20, 2015. Accepted February 18, 2016.
First Published Online February 24, 2016

Abbreviations: BAT, brown adipose tissue; BMP, bone morphogenetic protein; eWAT, epididymal white adipose tissue; HSL, hormone-sensitive lipase; iBAT, interscapular brown fat; BATIGFIRKO, BAT-specific knockout; BATIRKO, brown adipose tissue-specific knockout targeting the insulin receptor Igf1r; HSP-60, heat shock protein 60; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; iWAT, inguinal white adipose tissue; KO, knockout; mWAT, mesenteric white adipose tissue; NMR, nuclear magnetic resonance; rWAT, retroperitoneal white adipose tissue; UCP, uncoupling protein; VCO₂, carbon dioxide production; VO₂, oxygen consumption; WAT, white adipose tissue; WT, wild type.

doi: 10.1210/en.2015-1623

Endocrinology, April 2016, 157(4):1495–1511 press.endocrine.org/journal/endo 1495

The Endocrine Society. Downloaded from press.endocrine.org by \$\${individualUser.displayName} on 05 April 2016. at 01:45 For personal use only. No other uses without permission. All rights reserved.

Brown fat-specific double knockout of IGFIR/IR: Atrophy, uncoupling mechanisms failure, impaired thermogenesis and obesity (Artículo en revisión)

Vanesa Viana-Huete ^{1,2}, Carlos Guillén ^{1,2}, Gema García ^{1,2}, Silvia Fernández ^{1,2}, Ana García-Aguilar ¹, C.R. Kahn ³ & Manuel Benito ^{1,2}

(1) Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, Complutense University Madrid, Madrid-28040, Spain. (2) Spanish Diabetes and Associated Metabolic Diseases Research Center (CIBERDEM), Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain. (3) Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, MA-02215, U.S.A.

ABSTRACT

It is completely uncovered how the lack of IR/IGFIR in a tissue-specific manner does affect to brown fat development and mitochondrial function and its impact on the adipose organ. Thus, we have developed the IR/IGFIR double knockout (BATIGFIRDKO). Lack of those receptors caused a severe atrophy, loss of mitochondrial mass, mitochondrial damage related to cristae disruption, loss of mitofusins, and the loss of proteins involved in the cytosolic or mitochondrial integrity quality control machinery. In fact, DKO neonatal brown adipocytes showed an impaired mitophagic flux. More importantly, DKO mice showed an impaired thermogenesis upon cold exposure based on a failure in the mitochondrial fission mechanisms and a much lower UCP-1 content. As a result, DKO showed an obesity susceptibility revealed by increased body fat mass and insulin resistance. Upon excess energy exposure, that susceptibility progressed to a manifest obesity as shown by increased body weight, insulin resistance, hyperinsulinemia and enhanced circulating triglycerides.

The adipose organ includes two functionally and morphologically different types of adipose tissue in mammals: white adipose tissue (WAT), which is the primary site of dynamics triglyceride storage and brown adipose tissue (BAT), which is specialized in energy expenditure. In mammals, non-shivering thermogenesis has been associated with brown fat function in response to cold, cold-induced non-shivering thermogenesis, and to overfeeding, diet-induced non-shivering thermogenesis (1). In rodents, brown fat remains active for life. However, in humans largely disappears shortly after birth, and thus it has traditionally assuming that there is no functional brown fat present in adult humans. However, this concept has been radically revised by which have identified active brown fat in human studies, suggesting a critical role of brown fat in human adult energy metabolism and body weight control (2). Nowadays, it is recognized that there are at least two distinct types of brown fat cells allocated either in the classical brown adipose depots or as resident cells mainly within the inguinal white fat (3), the coregulatory protein PRDM16 (PR domain containing 16) playing a differential role between canonical brown adipose tissue and beige cells within the inguinal white fat (4).

Indeed, mitochondria play a central bioenergetics role in eukaryotic cells. Mitochondrial biogenesis it is essential to the onset of non-shivering thermogenesis. Regarding the novo mitochondriogenesis, however, the onset of the cytosolic quality control mechanisms assures mitochondrial integrity and functioning, maintaining a population of healthy mitochondria (5). Traditionally, heat production in response to hypothermia or excess energy intake has been associated to the collapse of the proton gradient by the increased expression and anchorage of the tissue-specific protein UCP1 (uncoupling protein 1) to the mitochondrial inner membrane. It is now recognized that the mitochondrial dynamics, an equilibrium between the mitochondrial fusion/fission status, it is essential to the adaptation to the cellular energy status. Calorie restriction or starvation favoring the fusion and the mitochondrial coupling (oxidative phosphorylation) and an excess of nutrient availability leading to the fission and mitochondrial uncoupling (collapsing the mitochondrial membrane potential) (6). Thus, in brown adipocytes mitochondrial fission has been proposed as an amplification pathway for energy expenditure (7).

Several developmental signaling molecules have been shown to influence the development of brown adipose tissue. These include nodal, wingless, fibroblast growth factors, members of the transforming growth factor TGF- β family, BMPs, and IGF1/Insulin signaling. Thus, we previously developed the first brown adipose tissue-specific knockout targeting the insulin receptor (BATIRKO). Those mice showed a severe brown fat lipotrophy because a depletion of lipid content and susceptibility to develop a moderate sporadic visceral adiposity upon aging (8). In addition, the lack of IGFIR (BATIGFIRKO) has just recently been proven to be dispensable for full brown fat development, but indispensable to maintain the full thermogenic capacity, the lack of IGFIR in BAT causing an impaired thermogenesis upon cold exposure (9). In the meantime, by the use of aP2 (adipocyte protein 2) or Adiponectin Cre promoters, it was demonstrated that the lack of IR/IGFIR in the adipose organ showed an almost complete absence of WAT and BAT. However, it is unrecognized how both receptors contribute to the onset of mitochondriogenesis, mitochondrial dynamics and quality control mechanisms to assure mitochondrial integrity and brown fat thermogenic functionality. More importantly, it is completely uncovered how the lack of the IR/IGFIR in a tissue-specific manner does impact on brown fat development, its mitochondrial function and the redistribution and enlargement of the adipose organ. To address those important issues, we have developed the IR/IGFIR brown adipose tissue-specific double knockout mice (BATIGFIRDKO). Our results show that the lack of IR/IGFIR in a conditional manner gave rise to a severe brown fat atrophy. In the remnant tissue, a loss in the expression of Porin (VDAC1, Voltage-dependent anion-selective channel protein 1) in parallel to a severe mitochondrial damage without the presence of autophagosomes, a loss in the UCP1 protein expression that induces uncoupling, a loss in the expression of Mitofusin-2 or Opa-1 (optic atrophy protein 1), both required for fusion-competent mitochondria and a loss in the expression of Pink-1 (PTEN-induced putative kinase protein 1) or Parkin, essential components of the mitochondrial labelling for mitophagy initiation was observed in DKO mice. On this regard, DKO and control neonatal preadipocytes were able to induce the autophagic flux in response to the oxidative stressor CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophenylhydrazine). However, the mitophagic flux or the initial mitochondrial labelling for mitophagy initiation was impaired in DKO versus control cells. More importantly, the mitochondrial fission mechanism in response to cold acclimation was impaired. As a result, DKO mice showed a thermogenic failure in response to a cold environment, a sporadic enhancement of body fat mass and global insulin resistance. Under excess nutrient environment (high fat diet), they showed an inhibition of the mitochondrial fission mechanism in

response to fatty acids input. Together the impaired fission mechanism and the loss of the UCP1 in the context of a severe brown fat atrophy contribute to the reduction of the energy sink and a failure in the thermogenic mechanism that may account for the increased body fat mass and body weight and sustained insulin resistance and hyperinsulinemia, without glucose intolerance, observed in those DKO versus control mice.

RESULTS

Role of IGF1R/IR in the brown adipose tissue histological and mitochondrial development and gene expression. Mice carrying a floxed *Igf1r* and *Ir* alleles were bred with mice carrying a Cre transgene driven by the *Ucp-1* promoter to produce BATIGFIRDKO (DKO) mice. Although recombination of the floxed alleles was proven in the DKO versus control mice, a faint expression of IGF1R or IR was observed in the BAT taken from DKO mice as compared with their littermate's controls, probably due to a white fat infiltration into the remnant tissue. By contrast, IGF1R or IR levels were unchanged in inguinal white fat, gastrocnemius skeletal muscle, heart and liver (Supplementary Fig. S1). Although the overall body development was not affected under chow diet (Fig. 1A), interscapular brown adipose tissue (iBAT) mass was severely affected in the DKO versus control mice (about 80% in terms of tissue mass/body weight) at 3-months (Fig. 1B, C). Interestingly, IGF-1, but not BMP-7 or T3, robustly enhanced in DKO versus control mice at 3-months (supplementary Table S3). In addition, the number of brown adipocytes was decreased and the cell size was larger in the remnant versus control brown fat tissue (Fig. 1D, E). Interestingly, lipid content was increased as visualized by the lower eosin staining in the larger adipocytes above described (Fig. 1B, lower panels), which was consistent with the diminished rate of *ex vivo* lipolysis in the remnant iBAT versus control tissue (Fig. 1F). Indeed, the mitochondrial development is a critical issue in a thermogenic tissue. Thus, we have explored the mitochondrial number and the mitochondrial area. Both parameters were significantly decreased in DKO versus control mice (Fig. 1H). More importantly, a severe mitochondria disruption (severely damaged or disrupted cristae) was observed by electron microscopy in the iBAT from the DKO versus control mice (Fig. 1G). On this regard, the mRNA expression of *Tfam* (Transcription factor A, mitochondrial) and the protein expression of PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), mitochondrial biogenesis markers, was almost impaired in the remnant versus normal iBAT (Fig. 2B, C). However, even though the severe damaged mitochondria above described, no univesicular or multivesicular autophagosome formation was observed in the remnant iBAT tissue. Then, we hypothesized that a failure in the autophagic/mitophagic process occurred in the atrophic brown fat versus controls. Thus, we explored the genetic expression of the protein markers involved in mitophagy, autophagy, reticulophagy, mitochondrial dynamics, thermogenesis and apoptosis. The expression of L3CB-II (Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta) remained unchanged in the control versus DKO mice. However, the expression of PINK-1, Parkin and p62 (SQSTM1, sequestosome 1) the docking protein for the mitophagy/autophagy ensemble machinery, severely decreased in the remnant versus control iBAT. Also, the expression of the mitochondrial dynamics machinery such as MFN-2 (mitofusin 2), p-DRP1 (Ser616)/DRP1 (Dynamin-related protein 1) ratio and OPA-1 L/S ratio dramatically decreased in the DKO versus control mice. Indeed, the down-regulation of OPA-1L/S is consistent with the mitochondrial cristae disruption above described. Regarding the thermogenic machinery, the significant decrease of UCP-1 expression together the dramatic decrease of the p-DRP1 (Ser616)/DRP-1 ratio anticipate a failure in the uncoupling mechanism involved in the thermogenic triggering in the DKO versus control mice. Regarding the endoplasmic reticulum integrity, the expression of BIP (Immunoglobulin heavy chain-binding protein) was almost impaired in the remnant versus control iBAT tissue. Finally, the expression of BCL-2 (B-cell lymphoma 2), the mitochondrial pathway anti-apoptotic protein was significantly decreased in the DKO versus control mice (Fig. 2A, B).

Role of IGF-1R/IR in the mitochondrial quality control mechanisms in neonatal brown preadipocytes. As stated above, we hypothesized that the autophagic/mitophagic mechanisms failed to in the remnant versus control iBAT tissue. To address that important issue, we investigated two kind of cytosolic quality control mechanisms in control and DKO neonatal brown preadipocytes: Firstly, we investigated the autophagic response as revealed by the expression of the membrane-bound isoform of L3CB II in response to 15 h CCCP treatment, a mitochondrial uncoupler, in the absence or presence of chloroquine (CQ), an inhibitor of autophagic flux at the autolysosome formation. Our results showed that the expression of the membrane-bound isoform of L3CB II in response to 15 h CCCP was significantly further

increased in the presence of chloroquine, in DKO or control cells (Fig. 3A). Secondly, we analyzed HADHA mitochondrial labelling by immunofluorescence in response to CCCP in the presence or absence of CQ. In 15-24 h CCCP-treated cells, we observed a significant HADHA clearance down to 30% in WT versus a significant one down to 60% in DKO cells (Fig. 3B). However, we clearly detected a significant increase in HADHA fluorescence signal up to 60% in WT cells, but not in DKO, in those cells treated with CCCP and CQ (Fig. 3B). Those data suggest that DKO brown preadipocytes showed a specific blockade at the mitophagic flux. Secondly, we explored the mitochondrial labelling for mitophagy initiation in both cell lines. Thus, in wild type cells confocal microscopy studies revealed a co-localization of TOM20, a mitochondrial marker, and p62, the mitophagy/autophagy ensemble protein, in response to 4 h CCCP treatment. However, in DKO cells that co-localization of TOM20/p62 was significantly impaired (Fig. 4B). These results, suggest a failure in the mitochondrial labelling for mitophagy initiation in the brown preadipocytes lacking IGFIR/IR receptors. Altogether our results suggest a much lower mitophagic flux, without changes in the autophagic flux, in DKO versus control brown preadipocytes.

Cold-induced thermogenic failure in DKO versus control mice. To assess the metabolic activity of brown adipose tissues, DKO and control mice were submitted to PET (positron emission tomography) analysis using ^{18}F -FDG ([18F]-2-fluor-D-2-deoxy-D-glucose) as a tracer for measuring the glucose uptake. As depicted in Fig. 5A, B, the metabolic activity in brown fat depots increased very significantly in response to a cold environment in control mice. However, DKO mice failed to enhance their BAT glucose uptake under the same experimental conditions. These results assure the deletion of the IR that results in an impairment in insulin-dependent glucose uptake by brown fat in the DKO versus control mice. In addition, mice maintained 48 h at thermoneutrality (28°C) were exposed to cold acclimation at 4°C. At 3 and 12 months, DKO mice showed a severe failure in maintaining their body temperature as compared to their controls. Thus, DKO mice drop their body temperature around 32°C versus 36°C observed in control mice upon 4 h of cold exposure (Fig. 5C). Upon 4h of cold exposure, a significant increase in T3 (triiodothyronine) plasma levels (a thermogenic hormone) in control, but not in DKO mice, was observed (Fig. 5E). However, we found no significant changes in the mRNA expression of *Dio2* deiodinase in DKO versus control mice under the same experimental conditions above described (Fig. 6A). Regarding BMP-7 (bone morphogenetic protein 7), a browning signal, its plasma levels were significantly enhanced in DKO versus control mice upon cold exposure (Fig. 5D). Conversely, iBAT BMP-7 protein levels were enhanced in control versus DKO mice under the same experimental conditions (Fig. 5F). Thus, the source of the differential BMP-7 circulating levels above described was mainly owing to its secretion from peripheral tissues. Regarding the molecular mechanisms that may contribute to energy expenditure in brown fat, we explored the triggering of the mitochondrial fission mechanism and the uncoupling status of the mitochondria as revealed by the UCP1 expression. Upon cold exposure, the mitochondrial pro-fission p-DRP1 (Ser616)/DRP1 ratio was significantly much higher in control versus DKO mice (Fig. 5F). In addition, the level of expression of OPA1 and the mitochondrial pro-fission S-OPA-1/L-OPA-1 ratio was significantly much higher in control versus control mice (Fig. 5F). Interestingly, the brown fat mitochondrial marker PGC1- α and the uncoupling marker UCP1 were expressed at much higher levels in control versus DKO mice (Fig. 5F). However, both genes showed a very similar rate of transcription in response to 4 h of cold exposure (Fig. 6A). These results suggest a failure in the rate of protein biosynthesis owing to the lack of insulin signaling in the iBAT from DKO versus control mice. Tfam showed a similar basal mRNA expression at thermoneutrality in DKO versus control mice. Upon cold exposure, no significant changes at transcriptional level were found. Finally, two potentially cold-response genes in brown fat *Fgf21* or *Arb3*, were studied. *Fgf21* showed a very low basal transcription in control mice. Upon 4 h of cold exposure, a huge increase in the mRNA expression was found in DKO versus control mice. *Adrb3*, the $\beta 3$ adrenoceptors, robustly increase its mRNA expression in DKO versus control mice. However, upon cold-exposure, their rates of transcription were down-regulated in control and DKO mice (Fig. 6A).

Inguinal white adipose tissue browning and adipose organ redistribution in DKO versus control mice. We extended our studies on the primary effect of the lack of IR/IGFIR receptors to the brown adipocyte resident cells within the white fat visceral or inguinal depots (browning). On this regard, we found more clusters of brown adipocytes within the inguinal fat depots from DKO mice that those found in those depots in control mice. More importantly, the UCP1 expression was higher as revealed by western-blot analysis in DKO versus control mice (Fig. 6B upper panel, C). However, no brown adipocyte clusters, but slightly protein levels of UCP1, were found in epididymal fat

depots from control and DKO mice. (Fig 6B lower panel, C). Regarding the adipose organ, body fat mass was significantly enhanced in three-month-old DKO versus control mice, as revealed by NMR analysis (Fig 7A, B). Thus, white fat depots such as epididymal, retroperitoneal and mesenteric fat depots mass were enhanced in DKO versus control mice. In addition, retroperitoneal and mesenteric fat depots maintained their cell size and number in WT and DKO mice. However, epididymal white depots showed larger cell size and lower cell number in DKO versus control mice. In contrast, inguinal fat mass was significantly slightly diminished, showing larger cell size and lower cell adipocyte number, in DKO versus control mice (Fig. 7C, D). However, we found no significant changes in the plasma levels of leptin, or adiponectin, or TNF- α , in DKO versus control mice at 3-months (supplementary Table S3).

Metabolic and endocrine status and differential organ-specific insulin sensitivity in DKO versus control mice. To assess the glycemic homeostasis and whole body insulin sensitivity of DKO versus control mice, we studied the glucose and insulin tolerance tests. Thus, glucose tolerance remained unchanged upon development in 3 and 12-months old in DKO versus control mice (Fig 8A). These results are consistent with the unchanged postprandial glycaemia found in DKO versus control mice (supplementary Table S3). However, insulin tolerance was impaired at 3 months and 12 months in DKO versus control mice. In fact, insulin secretion tests revealed that the plasma insulin levels remained in DKO above the curve in control mice (Fig 8A). At this stage, we hypothesized that insulin sensitivity was differentially impaired in a tissue-specific manner. To address that issue, we studied at 3-months the insulin sensitivity as assayed by Ser⁴⁷³ AKT phosphorylation in response to administered insulin in vivo in several major insulin target tissues (supplementary Fig. S2). In the liver, we found a robust insulin signaling in response to insulin in the control mice. That effect was lower in DKO mice. This result was consistent with the higher levels of plasma triglycerides found in DKO versus control mice (supplementary Table S3). A similar trend in the insulin signaling in response to insulin was found in the heart, in DKO versus control mice. Regarding the adipose organ, we found no significant changes in the insulin signaling in response to insulin in the epididymal, inguinal, retroperitoneal and mesenteric white fat in DKO versus control mice. These results are consistent with the unchanged leptin/adiponectin ratio, or TNF- α , plasma levels in DKO versus control mice above described, which in fact did not show any correlation with the enhanced fat mass in the corresponding tissue from the adipose organ above described (Fig. 7C).

Effect of excess energy exposure (HFD) on mitochondrial fission mechanisms, adipose organ redistribution and metabolic status in DKO versus control mice. Based on the severe impaired thermogenesis above described in DKO versus control mice upon cold-exposure, we hypothesized an energy imbalance upon excess energy exposure in those mice respectively. To address this important issue, we submitted DKO or control mice to high fat diet (HFD) for 8 weeks upon suckling-weaning transition. Overall, DKO mice showed a 20% overweight on average as compared with their controls (Fig. 9B). However, DKO food intake parameter remained below the corresponding one in the curve of controls (Fig 9D). Nuclear magnetic resonance (NMR) revealed a 70% increase in the body fat mass in DKO versus controls (Fig. 9C). In fact, epididymal, retroperitoneal and mesenteric fat depots significantly moderately increased in DKO versus control mice. However, inguinal fat decreased and iBAT severely decreased under the same conditions (Fig 9 E, F). These results are entirely consistent with the huge increase in the plasma leptin/adiponectin ratio, without significant changes in circulating TNF- α , upon HFD (supplementary Table S3). At this stage, we explored the contribution of the mitochondrial fission mechanisms to brown fat thermogenesis upon excess energy exposure. Thus, the pro-fission p-DRP-1/DRP-1 ratio was slightly lower in DKO versus controls. The S-OPA-1/L-OPA-1 ratio increased in DKO versus and control mice upon cold exposure. However, the pro-fission isoform S-OPA-1 was significantly much lower in DKO than in control mice under the same experimental conditions. In addition, mitochondrial content, as revealed by the expression of the membrane integral protein marker VDAC (porin), was much lower in DKO than in control mice (Fig. 9A). Regarding the metabolic or endocrine status, DKO and control mice showed a moderate glucose intolerance. However, DKO mice showed a severe insulin resistance as compared with their corresponding controls. Insulin secretion test revealed a huge compensatory insulin secretion upon glucose injection in DKO versus controls (Fig 9G, H, I). In fact, those DKO versus control mice showed a severe hyperinsulinemia, without a significant change in their postprandial glycaemia (supplementary Table S3). In addition, we found a significant hypertriglyceridemia in DKO versus

control mice. These results are consistent with the very high leptin/adiponectin ratio observed in DKO versus control mice (supplementary Table S3) and suggest a mobilization of lipids from the adipose organ to peripheral tissues.

DISCUSSION

We have developed the DKO mice (IGFIR/IR) in a brown fat-specific manner. Our data show that mice with a complete knockout of IGFIR/IR in brown fat-specific manner (BATIGFIRDKO) display normal body weight development. However, a robust increase in the circulating IGF1 occurred in DKO versus control mice. In contrast, adipose organ-specific IGFIR/IR DKO (FIGIRKO) mice showed a loss of body weight (microsomy) owing to a severe white and brown adipose atrophy (10). More importantly, the IGFIR/IR DKO in skeletal muscle-specific manner showed over 50% atrophy of skeletal muscles (11). On this regard, we observed a severe brown fat atrophy (10-20% remnant versus control iBAT tissue). In contrast, DKO versus control mice in a pancreatic beta cell-specific manner (β DKO) showed normal pancreatic islets development (12). The histological studies of the remnant brown fat tissue showed a higher lipid content as revealed by a poor eosinophilia. These results are fully consistent with the *ex vivo* inhibition of lipolysis in DKO versus control mice. On this regard, PKA-mediated lipolysis is mediated by the interaction between perilipin-1 and OPA-1 (13), in fact a mitochondrial fusion protein down-regulated in DKO mice. Interestingly, the poor eosinophilia above described contrasted with the robust eosin staining previously described in the iBAT from BATIRKO mice (8). Based on the fact that the DKO was conditionally driven by the activation of the *Ucp1* promoter on a mesenchymal tissue bearing high number of IGFIR (brown fat), in fact UCP1 is being expressed perinatally in rodents, thus the deletion of IGFIR may anticipate to the major expression of the IR later on along postnatal development. Thus, the impact of IR deletion in the DKO on lipid depletion would be confined to a minimum. Also, it is relevant the observed correlation among the inhibition of the lipolytic rate, a lower HSL protein expression, higher lipid content and hypertrophic brown adipocytes in the remnant brown fat tissue. On this regard, targeted disruption of hormone-sensitive lipase resulted in brown adipocyte hypertrophy, but in a lesser extent in the white adipose tissue (14). Regarding mitochondrial biogenesis, we found a lower number of mitochondria per cell, showing a smaller size, in the remnant versus control iBAT tissue. More importantly, mitochondria cristae were severely disrupted in DKO versus control mice. Consistently, a loss in the expression of VDAC1, a marker of mitochondrial content, a loss in the UCP1, a mitochondrial uncoupling marker, a loss of PGC-1 α , a marker of mitochondrial biogenesis, a loss in the expression of MFN-2, required for fusion-competent mitochondria, a loss in the expression of p-DRP-1/DRP-1, required for fission-competent mitochondria (7), a loss of OPA-1, required for mitochondrial cristae ensemble and a loss in the expression of PINK-1 and PARKIN, essential components of the mitochondrial labelling for mitophagy initiation was observed in DKO versus control mice. On this regard, PINK-1 is required for optimal IGF-1 and insulin dependent signal transduction (15). However, even though the severe damaged mitochondria above described, no univesicular or multivesicular autophagosome formation was observed in the remnant versus control iBAT tissue. These results strongly suggested a severe failure in the mitochondrial integrity quality control mechanisms. To address this important issue, we generated brown preadipocyte cell lines from neonatal iBAT tissue bearing or not IGFIR/IR receptors. Thus, DKO versus control cells showed a mitophagic flux failure, but not an autophagic failure, in response to an oxidative uncoupler. More importantly, the mitophagic failure was associated with an impairment of the mitochondrial labelling with p62 for mitophagy initiation, a major mechanism among multiple one already described for regulation of mitophagy in mammals (5). On this regard, p62 has already been described as link between β -adrenergic input and mitochondrial function and thermogenesis (16).

Traditionally, heat production in response to hypothermia or excess energy intake has been associated to the collapse of the proton gradient by the increased expression and tethering of the tissue-specific protein UCP1 in the mitochondrial inner membrane. It is now recognized that mitochondrial dynamics, an equilibrium between the mitochondrial fusion/fission status, it is essential to the adaptation to the cellular energy status. Calorie restriction or starvation favoring their fusion and the mitochondrial coupling (oxidative phosphorylation) and an excess of nutrient availability leading to their fission and mitochondrial uncoupling (collapsing the mitochondrial membrane potential) (6). Thus, in brown adipocytes mitochondrial fission has been proposed as an amplification pathway for energy expenditure (7). Indeed, cold exposure induces hypothermia and triggers the non-shivering thermogenesis. That mechanism, that implies an enhanced metabolic activity by the brown fat, is severely impaired as revealed by PET analysis or cold acclimation in DKO versus control mice. However, that

failure may be dissected into two distinguishable mechanisms contributing to the mitochondria uncoupling and energy dissipation. Firstly, the contribution of UCP1 protein expression to the uncoupling mechanisms is much affected in DKO versus control mice at two levels: a much lower UCP1 content and lower rate of UCP1 synthesis upon a short cold exposure. On this regard, the ablation of *Ucp1* induced obesity and impaired thermogenesis in mice (17). Secondly, the contribution of the fission mechanisms to the energy expenditure was impaired in DKO versus control mice upon cold exposure. On this regard, DRP-1 phosphorylation involved in the mitochondrial fission was impaired in DKO versus control mice upon cold exposure. In addition, the balance between L-OPA-1 and S-OPA-1 mediated by the mitochondrial proteases YME1L and OMA1 balance mitochondrial fusion and fission (18). Thus, higher expression of S-OPA-1 may trigger mitochondrial fragmentation, mitochondrial uncoupling and energy expenditure in control mice. That mechanism is impaired in DKO mice. However, the transcriptional activity of some iBAT genes in response to cold exposure not homogeneously affected in DKO versus control mice. Thus, few genes such as *Ppargc1a* or *Fgf21* enhanced their rate of transcription upon acute cold exposure, suggesting a compensatory mechanism to the severe brown fat atrophy, in DKO mice. However, other genes such as *Dio2* or *Ucp1* slightly decreased their rate of transcription under the same experimental conditions. Interestingly, the levels of mRNA expression of *Adrb3*, the target for the sympathetic response by acute cold exposure, were higher at thermoneutrality or upon cold exposure in DKO versus control mice, again suggesting a compensatory mechanism.

Nowadays, it is recognized that there are at least two distinct types of brown fat cells allocated either in the classical brown adipose depot or as resident cells mainly within the inguinal white fat. Based on the fact of the severe canonical brown fat atrophy observed in DKO versus control mice, we explored the presence of beige cells in the epididymal or inguinal fat pads from those mice. Surprisingly, we found an increased number of beige cell clusters, as visualized by anti-UCP-1 immunohistochemistry, in DKO than in control mice. Those beige cell clusters were missing in our immunohistochemical studies carried out from epididymal fat pads from control and DKO mice. These results were corroborated by the enhanced UCP-1 expression in the inguinal fat in DKO versus control mice. Thus, the enhanced number of beige cell clusters within the inguinal fat pads may be interpreted as a compensatory mechanism to the severe canonical brown fat atrophy seen in DKO versus control mice. On this regard, BMP-7, may be ruled out as compensatory browning signal owing to their unchanged plasma levels and the failure of the intratissual expression upon cold exposure in the remnant brown fat from DKO mice. Whether other browning signal such as the natriuretic peptide (19), or meteorin-like factor (20) may be involved in the compensatory mechanism above described remains to be established. These results contrasted with those previously described in BATIGFIRKO mice showing an almost impaired browning effect within the inguinal white fat (8). These results suggest that only the lack of IGFIR/IR signaling in the emerging beige cells within the inguinal fat gives rise to a compensatory signaling. At this stage, we hypothesized that an impaired brown thermogenesis would induced a susceptibility to increase the body fat mass. Indeed, DKO mice showed an enhanced body fat mass and a redistribution of the adipose organ as compared with their controls. More importantly, those mice manifest an insulin resistance, compensated by an increased insulin secretion, with the outcome of glucose tolerance. However, at 3 months, leptin/adiponectin ratio was slightly increased, without changes in the circulating TNF- α . Upon obesogenic high fat diet, we explored the contribution of the mitochondrial dynamics to brown fat energy expenditure. DKO versus control mice, within a scenario of a lower mitochondrial content in the brown fat, showed a lower content of the mitochondrial proteins p-DRP1 and S-OPA-1. Thus, the susceptibility to adiposity in DKO mice progressed into a manifest obesity as revealed by the increased body weight, very high levels of circulating IGF-1, body fat mass, insulin resistance, severe hyperinsulinemia, hyperleptinemia, and enhanced hypertriglyceridemia. Overall, our data suggest a cause and effect relationship between a failure in the brown fat thermogenesis and an increased adiposity and obesity susceptibility. In fact, the ablation of the BAT by means of toxins induced obesity in rodents (21). However, that relationship was challenged by the lean phenotype of FIGIRKO mice. Those mice, paradoxically, although bearing a severe brown fat atrophy and having an impaired thermogenesis showed a lean phenotype and also obesity resistance when were fed on high fat diet (10, 22).

In conclusion, the lack of IR/IGFIR receptors caused a severe brown fat atrophy and mitochondrial damage related to cristae disruption, the loss of mitofusins that regulates the mitochondrial dynamics, and also the loss of essential components of the protein machinery

involved in cytosolic or mitochondrial integrity quality control in the remnant brown fat. However, DKO mice increased the number of beige cell clusters observed within the inguinal fat. In the balance, DKO versus control mice showed an impaired thermogenesis upon cold exposure based on a failure in the mitochondrial fission mechanisms and a much lower UCP1 transcription rate and content. As a result, DKO versus control mice showed an obesity susceptibility as revealed by increased body fat mass and insulin resistance, without glucose intolerance. Upon excess of energy exposure, DKO versus control mice showed a manifest obesity as revealed by the increased body weight, increased adiposity, circulating leptin, insulin resistance, hyperinsulinemia and enhanced circulating triglycerides (see Fig. 10).

METHODS

Experimental models and mice genotyping. To create a specific BAT inactivation of the *Igf1r* and *Ir*, we bred *Ucp1-Cre*⁺, double *Igf1r* (exon 3) and *Ir* (exon 4) floxed mice, previously described (12) with *Ir/Igf1r* double floxed, *Ucp1-Cre*⁺ transgenic mice (8) in order to obtain BAT-specific *Igf1r/Ir* double knockout (BATIGFIRDKO) mice. Experiments were performed on *Igf1r/Ir* double floxed (hereafter referred as control or WT) and BATIGFIRDKO male mice maintained on a mixed 129/SvJ C57BL/6 background. Mice were maintained in the Animal Care Facility under the standard conditions of temperature, 12 h light/dark cycle and were fed on standard diet (3% calories from fat, A04) and on high fat diet (63% calories from fat, 21.4% carbohydrates and 18.3% proteins was from Envigo, Cambridge, UK) for 8 weeks.

All animal experimentation described in this manuscript was conducted according with accepted standards of human animal care, as approved by the corresponding institutional committee. *Igf1r/Ir* double floxed and *Ucp1-Cre* transgenic mice were genotyping by PCR. Tail DNA (100–200 ng) was amplified 30 cycles (40 s, 94°C; 40 s, 60°C; and 1 min, 75°C) by a thermal cycler. Two primers flanking the *loxP* site behind exon three of the *Igf1r* were used: the forward primer (5'-ATGAATGCTGGTGAGGGTTGTCTT-3') and the reverse primer (5'-ATCTTGAGATGGTGGTCTGTTTC-3'). A 310-bp band was obtained for the floxed allele or a 250-bp band for the wild-type allele. For *Ir* we used two primers that flanked the *loxP* site behind exon four: the forward primer (5'-CTGAATAGCTGAGACCACAG-3'), reverse primer (5'-GATGTGCACCCCATGCTCTG-3'). A 300-bp band was obtained for the floxed allele or a 270-bp band for the wild-type allele. *Ucp1-Cre* transgenic mice were genotyping as previously described (8).

Cell culture and brown preadipocytes cell lines generation.

Brown preadipocytes cells were isolated and immortalized from newborn mice with both floxed *Ir* and *Igf1r* alleles and were used as WT. DKO brown preadipocyte cell lines were generated from immortalized *Ir* and *Igf1r* floxed brown preadipocytes infected with an adenovirus encoding Cre recombinase, as previously described (23,24). Cells were maintained in DMEM (4.5 g/l Glucose) containing: 10% (v/v) fetal calf serum, HEPES 10 mM, Penicillin G (12 µg/ml), Streptomycin (10 µg/ml) from Lonza (Basel, Switzerland) at 37 °C in a 5% CO₂ environment. To assure mitochondrial quality control mechanisms study in WT and DKO cell lines, we stimulated those cells with CCCP 20 µM for 4, 15 or 24 hours and in some experiments, 20 µM CQ for blocking the autophagic flux was used.

Protein extraction and western blot. WT and DKO mice were sacrificed by cervical dislocation and the different tissues were lysed as described (25). Western blot analyses were performed in iBAT, iWAT (inguinal white adipose tissue), eWAT (epididymal white adipose tissue), rWAT (retroperitoneal white adipose tissue), mWAT (mesenteric white adipose tissue) gastrocnemius, heart, liver as previously described (26). Brown preadipocytes cell lines were washed twice with cold PBS and scraped with RIPA buffer (Thermo Scientific) with a protease inhibitor cocktail. The antibodies used were anti-IGF1Rβ (C20, sc-713), IRβ (C19, sc-711) from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, USA). Antibodies anti-HSL (#4107), phospho-DMP1 (Ser616) (#3455), BCL-2 (#2876), LC3A/B (#4108), PGC1-α (#2178) and BIP (#3177) were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-BMP7 (#5626-1) was from Epitomics (Burlingame, CA, USA). Anti-Parkin (ab15954), Mitofusin 2 (ab56889), VDAC1 (ab15895), UCP1 (ab10983) were from Abcam (Cambridge, UK). Anti-DLP1 (611112) and OPA1 (612606) were from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Anti-PINK1 (BC100-494) was from Novusbio (Littleton, CO, USA). Anti-β-actin and α-tubulin from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) was used as a loading control in all membranes and different membranes were subjected to each immunodetection. All antibodies were prepared in 1X TBS, 0.1 % Tween. Immunoreactive bands were visualized using the Clarity™ECL western blotting protocol (Biorad, Hercules, California, USA).

Ex vivo lipolysis assay. BAT from WT and DKO 3-month-old mice was removed, weighted and placed in pre-warmed Krebs buffer for 5 min. The samples were used to *ex vivo* lipolysis assays as previously described (27).

PCR and qRT-PCR. Total RNA was extracted from BAT by TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA (3µg) was reverse transcribed with a high-capacity complementary DNA (cDNA) reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. The gene expression of *Ppargc1a*, *Tfam*, *Adrb3*, *Dio2*, *Ucp1* and *Fgf21* were analyzed by real-time quantitative PCR using Taqman probes and GAPDH as endogenous control using a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The results were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method as previously described (28). In order to corroborate BAT *Igf1r/Ir* deletion, 500 ng of BAT cDNA were amplified 1 cycle of 95°C for 5 min, 40/35 cycles (95°C 30 s, 62°C/58°C 30 s, 72°C 1 min) followed by one cycle of 72°C for 10 min on a thermal cycler. We used two primers flanking the *loxP* site behind exon 3 of *Igf1r*: forward primer (5'-CCGCTGCTGGACCACAAATC-3') and reverse primer (5'-CTTCATCGCCGAGACTTTG-3') and two primers flanking the *loxP* site behind exon 4 of *Ir*: forward primer (5'-CTGTTCGGAACCTGATGAC-3') and reverse primer (5'-ATACCAGAGCATAGGAG-3'). A 398 bp or 512 bp band was obtained for the floxed allele of *Igf1r/Ir* respectively and an 85 bp or 363bp band was obtained when the *Igf1r* exon 3 or *Ir* exon 4 was deleted.

Immunohistochemistry. For UCP1 immunohistochemistry, iWAT and eWAT sections from 3-month-old mice were incubated with rabbit polyclonal UCP1 antibody (Abcam, ab10983) at 2 mg/ml in PBS-T/1% BSA overnight at 4°C. Secondary antibody incubation and developing using diaminobenzidine substrate kit was performed as previously described (4).

Immunofluorescence and co-localization analysis by confocal microscopy.

Cells were grown on glass coverslips on normal culture dishes. Then, cells were fixed using paraformaldehyde 4% for 15 minutes at room temperature (RT). After fixing, cells were permeabilized in PBS with 0.5% Triton X-100 for 10 min and then blocked (3% BSA, 0.1% Tween 20 in PBS) for 1 h. Cells were incubated o/n at 4°C with primary antibodies (1:75 dilution in blocking solution): anti-TOMM20(ab56783) and anti-HADHA (ab54477) were from Abcam and anti-p62 (GP62-C) was purchased from Progen Biotechnik GmbH (Heidelberg, Germany). After the incubation, coverslips were incubated with the corresponding secondary antibodies (dilution 1:100) for 1 hour at room temperature and DNA was stained with DAPI. For analyzing HADHA clearance by immunofluorescence we used ImageJ (v1.48, NIH), an outline was drawn around each cell; circularity, area and mean fluorescence were measured, along with several adjacent background readings. Then, we measured total corrected cellular fluorescence (TCCF) = integrated density - (area of selected cell x mean fluorescence of background readings) as previously described in (29). For colocalization analysis SP-2 AOBS inverted microscope (Leica) was used. Images were collected using a 63X Zeiss objective (numerical aperture = 1.4). All images were obtained in a 1,024 × 1,024 pixel format. Images were processed with Coloc2 (Coloc 2 is Fiji's plugin for colocalization analysis; (<http://fiji.sc/Fiji>)). The threshold was obtained automatically using Costes automatic threshold and Manders' coefficient was determined (30, 31).

Electron microscopy.

BAT samples from three WT of DKO mice were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Tech), 2.5% glutaraldehyde grade I (Sigma) in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.3) for 4 hours at 4°C. Samples were post-fixed in 1% OsO4 (Electron Microscopy Sciences) 1.5% K4 [Fe (CN)6] during 1 h, dehydrated with acetone and embedded in Epon-812 (Taab). Thin sections (60–70 nm) were obtained with an Ultracut E (Leica) ultramicrotome, stained with lead citrate and examined under a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL) in the Electron Microscopy Center at Complutense University of Madrid (Madrid, Spain). For quantification, we measured the number and mitochondria area from at least 18 cells per animal.

Thermogenic response to cold exposure. For the acute cold exposure experiment, 3 and 12-month-old WT and DKO male littermates that had been acclimatized to thermoneutrality (28°C) for 3d were transferred to 4°C for 12 h with full access to water and food. Body temperature was measured periodically by using a digital thermometer with a colonic probe (BIO-9882; Bioseb, Vitrolles, France). Twelve months-old WT and DKO mice were euthanized under thermoneutrality conditions or after 4h of cold exposure. Plasma and brown adipose tissue were obtained and processed for subsequent analysis.

Metabolic efficiency: energy storage by nuclear magnetic resonance (NMR). WT and DKO 3-month-old mice fed with standard diet or mice fed with HFD for 8 weeks were anesthetized with isoflurane; respiration was continuously monitored, and body fat was measured using a BrukerBioSpin (BioSpec: 47/40, Ettlingen, Germany) as previously shown (32). The results were represented as fat body volume versus total body volume using Image J Launcher 1.46 software.

Positron Emission Tomography-Computed Tomography (PET/CT). PET/CT studies were realized in the Brain Cartography Center at Complutense University of Madrid (Madrid, Spain). To assess the iBAT glucose uptake in WT and DKO mice, animals were anesthetized with isoflurane and then were injected intraperitoneally with 11.1 MBq of ^{18}F FDG used as a radioactive tracer. We measured the glucose uptake at room temperature (26°C) or at 4°C. Different images of PET and CT were taken with the hybrid PET/CT scan from Oncovision (Valencia, Spain) and results were analyzed with PMOD software 3.0 version (Pmod Technologies, Zurich, Sweden). Results were showed as a SUV value (standard uptake value).

Hematoxylin-eosin staining and adipocytes size and number quantification. Freshly isolated brown and white fat depots collected from WT or DKO mice were fixed in 10% formalin for 24 h and embedded in paraffin for histological analysis. Different sections (5- 7µm thick) were deparaffinated and rehydrated to be stained with hematoxylin and eosin. All images were taken at 20X magnification and individual adipocyte area and cell number was determined using image analysis software (Image J Launcher 1.46U.S. NIH, Bethesda, MD, USA). Relative adipocyte size from four animals (WATs) or three (iBAT) per group was calculated µm² by quantitation of 200 adipocytes per mouse. Adipocyte number was calculated by counting all the adipocytes per image in at least 6 images per mouse.

Glucose tolerance test (GTT), insulin tolerance test (ITT) and insulin secretion test (IST). Glucose and insulin tolerance tests were performed on 3 or 12 months-old WT and DKO mice as described (33). Mice were fasted the previous day for the glucose tolerance test and all test were done in the morning at the same hour.

Plasma analysis. Plasma insulin, leptin, adiponectin, TNF-α, triiodothyronine (T3), IGF1 and BMP7 levels were measured from blood collected from standard or HFD 8 weeks-fed mice by enzyme-linked immunosorbent assays according to the manufacturer's instructions. Rat/mouse insulin ELISA kit (#EZRM1-13K), mouse leptin ELISA kit (#EZML-82K), mouse adiponectin ELISA kit (#EZMADP-60K), mouse TNF- α ELISA kit (EZMTNFA) were from Merck-Millipore (Darmstadt, Germany). Mouse/rat triiodothyronine ELISA (KA0925) was from Abnova (Taipei, Taiwan), mouse IGF1 ELISA kit (RAB0229) was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and mouse BMP7 ELISA kit (EMBM7) were from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Triglycerides and cholesterol were tested in serum samples using an enzymatic colorimetric assay from Spinreact (Girona, Spain).

In vivo insulin signaling analysis. For *in vivo* insulin signaling studies, fed WT and DKO 3-month-old mice were injected with 1 unit/kg body weight of human insulin (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) into the peritoneal cavity. After 15 min, liver, iBAT, gastrocnemius, heart and different white adipose tissue depots were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. We used p-AKT/Akt ratio as marker of insulin sensitivity. Blots of samples from three individuals for each group (WT and DKO mice injected with saline solution or with insulin) were used. The antibodies used were anti-phospho-Akt (Ser 473, #9271) and total Akt (#9272) from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Data analysis. All values were expressed as means ± SEM. Statistical significance was tested with the unpaired Student's *t* test or with the 1-way or 2-way ANOVA followed by the Tukey test if differences were noted (Graph Pad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA). The null hypothesis was rejected when the *p* value was less than 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Grants SAF2011/22555 and SAF2014-51795-R from Ministerio de Ciencia e Innovación, and Spanish Diabetes and Associated Metabolic Research Network (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III, Spain.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VV: has participated in the design of the study, acquisition of data, analysis and interpretation of data, statistical analysis and helped to draft the manuscript. CG, GG, SF and AG: have participated in the acquisition of data, statistical analysis and interpretation of data. CRK: has

participated in the discussion of the study. MB: has participated in the design of the study and its coordination, analysis and interpretation of data and writing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

COMPETING FINANCIAL INFORMATION

The authors have no financial conflict interests to disclose.

MATERIAL AND CORRESPONDENCE

Address all correspondence and requests for reprints to: Manuel Benito, Biochemistry and Molecular Biology Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Madrid 28040, Spain. Email: mbenito@ucm.es.

REFERENCES

1. Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359 (2004).
2. Cypress, A.M. *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517 (2009).
3. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine* **19**, 1252-1263 (2013).
4. Cohen, P. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* **156**, 304-316 (2014).
5. Mishra, P. & Chan, D.C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* **212**, 379-387 (2016).
6. Liesa, M. & Shirihai, O. Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metabolism* **17**, 491-506 (2013).
7. Wikstrom, J.D. *et al.* Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure. *EMBO J* **33**, 418-436 (2014).
8. Guerra, C. *et al.* Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J. Clin. Invest* **108**, 1205-1213 (2001).
9. Viana-Huete, V. *et al.* Role of IGFIR in the onset of male brown fat thermogenic function: Regulation of glucose homeostasis by differential organ-Specific insulin sensitivity. *Endocrinology* **157**, 1495-1511 (2016).
10. Boucher, J. *et al.* Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun* **3**, 902-921 (2012).
11. O'Neill, B.T. *et al.* Insulin and IGF-1 receptors regulate FoxO-mediated signaling in muscle proteostasis. *J. Clin Invest.* **126**, 3433-3446 (2016).
12. Ueki, K. *et al.* Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic b cells causes overt diabetes. *Nat. Genetics* **38**, 583-588 (2006).
13. Greenberg, A.S. *et al.* Lipid droplet meets a mitochondrial protein to regulate adipocyte lipolysis. *EMBO J* **30**, 4337-4339 (2011).
14. Osuga, J.I. *et al.* Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *PNAS* **97**, 787-792 (2000).
15. Akundi, R.S. Zhi, L. & Büeler, H. PINK1 enhances insulin-like growth factor-1-dependent Akt signaling and protection against apoptosis. *Neurobiol Dis.* **45**, 469-478 (2012).
16. Müller, T.D. *et al.* p62 Links β -adrenergic input to mitochondrial function and thermogenesis. *J Clin Invest.* **123**, 469-478 (2013).
17. Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B. & Nedergaard, J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metabolism* **9**, 203-209 (2009).
18. Anand, R. *et al.* The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* **204**, 919-929 (2014).
19. Bordinchia, M. *et al.* Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* **122**, 1022-1036 (2012).

20. Rao, R.R. *et al.* Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to Increase beige fat thermogenesis. *Cell* **157**, 1279-1291 (2014).
21. Lowell, B.B. *et al.* Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* **366**, 740-742 (1993).
22. Boucher, J. *et al.* Differential roles of Insulin and IGF-1 receptors in adipose tissue development and function. *Diabetes* **65**, 2201-2213 (2016).
23. Klein, J., Fasshauer, M., Ito, M., Lowell, B.B., Benito, M. & Kahn, C.R. Beta (3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem.* **274**, 34795-802 (1999).
24. Boucher, J., Macotela, Y., Bezy, O., Mori, M.A., Kriauciunas, K. & Kahn, C.R. A kinase-independent role for unoccupied insulin and IGF-1 receptors in the control of apoptosis. *Sci Signal.* **3**, ra87 (2010).
25. Brüning, J.C. *et al.* A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* **2**, 559-69 (1998).
26. Valverde, A.M., Lorenzo, M., Pons, S., White, M.F. & Benito, M. Insulin receptor substrate (IRS) proteins IRS-1 and IRS-2 differential signaling in the insulin/insulin-like growth factor-I pathways in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol.* **12**, 688-697 (1998).
27. Turpin, S.M. *et al.* Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 Ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metabolism* **20**, 678-686 (2014).
28. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
29. McCloy, R. A., Rogers, S., Caldon, C. E., Lorca, T., Castro, A., & Burgess, A. (2014) Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle* **13**, 1400-1412 (2014).
30. Manders, E., Stap, J., Brakenhoff, G., van Driel, R., & Aten, J. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* **103**, 857-862 (1992).
31. Costes, S.V., Daelemans, D., Cho, E.H., Dobbin, Z., Pavlakis, G., & Lockett, S. Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells. *Biophys J.* **86**, 3993-4003 (2004).
32. Garcia-Guerra, L. *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 plays a relevant role in insulin resistance and obesity. *Diabetes* **59**, 2407-2417 (2010).
33. Guillen, C., Bartolome, A., Vila-Bedmar, R., García-Aguilar, A., Gomez-Hernandez, A. & Benito, M. Concerted expression of the thermogenic and bioenergetic mitochondrial protein machinery in brown adipose tissue. *J Cell Biochem* **114**, 2306-2313 (2013).

13

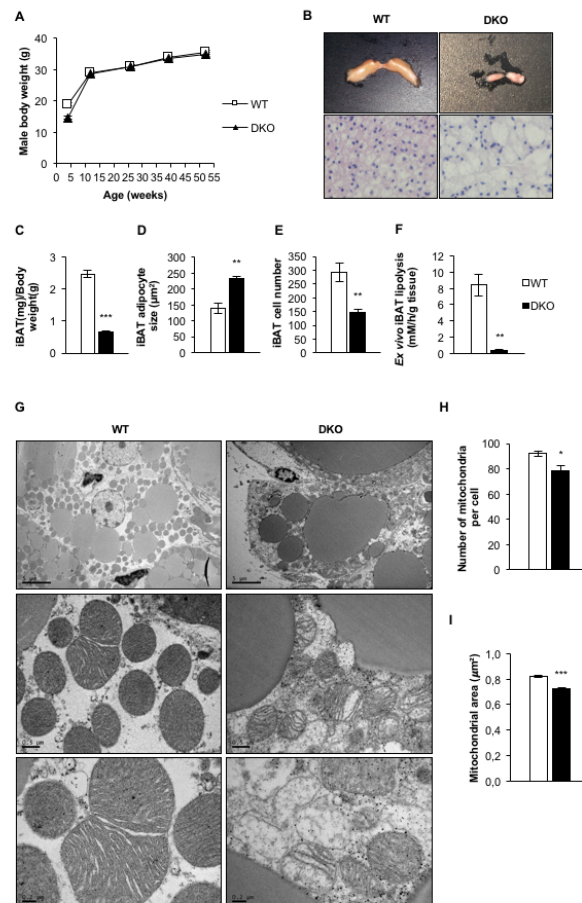


Figure 1. The lack of IGFIR/IR caused a severe brown fat atrophy, loss of mitochondrial mass and mitochondrial cristae disruption

A: Body weight of male WT (n=58/52/24/14/23) and BATIGFIRDKO (n=61/36/15/10/29) mice fed a standard diet. **B:** Representative image of interscapular brown adipose tissue depot in 3-month-old WT and DKO mice (upper panels), Hematoxylin and eosin stained sections of iBAT from 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice (lower panels) Magnification 20X. **C:** Graph indicating the iBAT weight/body weight ratio in 3-month-old WT (n=15) and DKO (n=19) mice. **D:** Brown adipocyte size (μm^2) from iBAT compartment is shown comparing WT (n=3) and DKO (n=3) mice from 3-month-old mice (200 adipocytes per group) at magnification, 20X. **E:** Adipocyte number quantification from iBAT compartment comparing 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice from 3-month-old (6 images per group). **F:** *Ex vivo* iBAT lipolysis experiment comparing WT (n=5) and DKO mice (n=3). **G:** Representative electron micrographs from iBAT samples of 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice, scale bars 5 μm (upper panels), 0.5 μm (middle panels) and 0.2 μm (bottom panels). **H:** Number of mitochondria per cell quantification from 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) of 15 cells per animal. **I:** Quantification of mean mitochondrial area (μm^2) from 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice of 15 cells per animal. All results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by two-tailed Student t test. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ between WT and DKO groups.

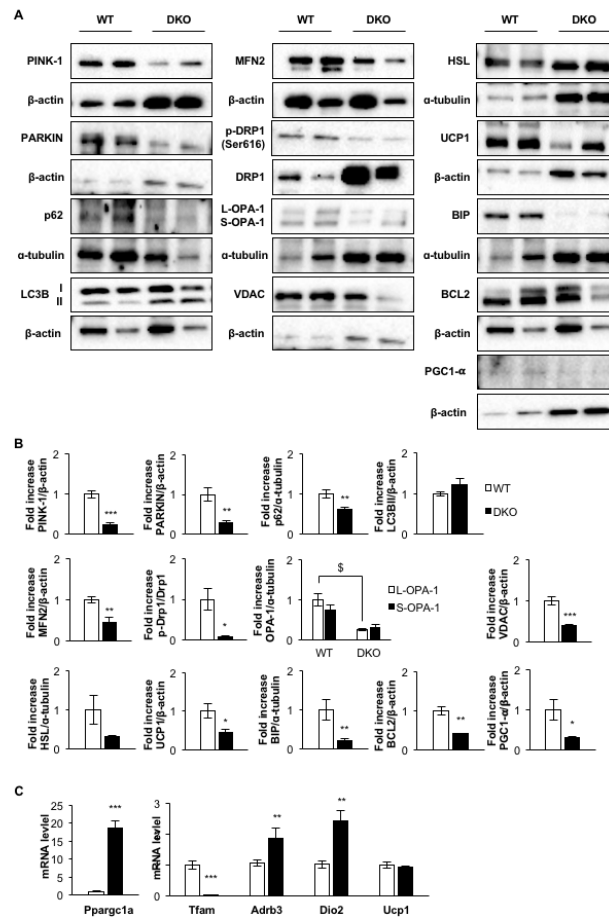


Figure 2. Loss of essential protein components of the cytosolic quality control mechanisms, mitochondrial dynamics, mitochondrial biogenesis, uncoupling mechanisms, endoplasmic reticulum and apoptosis in DKO mice. **A:** Representative western blotting from iBAT showing different regulators of cytosolic quality control mechanism, mitochondrial dynamics and biogenesis, and brown fat functionality comparing 3-month-old WT and DKO mice. **B:** Western blotting quantification of BCL2, HSL and PGC1- α (n=3 WT, n=3 DKO); p-Drp1/Drp1, OPA-1 (n=4 WT, n=4 DKO); LC3B (n=6 WT, n=5 DKO); UCP1, MFN2 and PARKIN (n=6 WT, n=6 DKO); PINK1 (n=6 WT, n=7 DKO); P62 (n=7 WT, n=6 DKO); BIP (n=8 WT, n=7DKO) and VDAC (n=8WT, n=8DKO). **C:** Plot indicating fold-increased mRNA levels of Dio2 (n=6WT, n=3 DKO); Pparg1a, Tfam and Ucp1 (n=7 WT, n=3 DKO) and Adrb3 (n=9 WT, n=3 DKO) genes in iBAT from 3-month-old mice. All results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by two-tailed Student t test. * P< 0.05; ** P< 0.01; *** P< 0.001 between WT and DKO groups. Statistical significance of OPA-1 was assessed by 1-way ANOVA followed by the Tukey test. \$ P < 0.05 L-OPA-1 between WT and DKO groups.

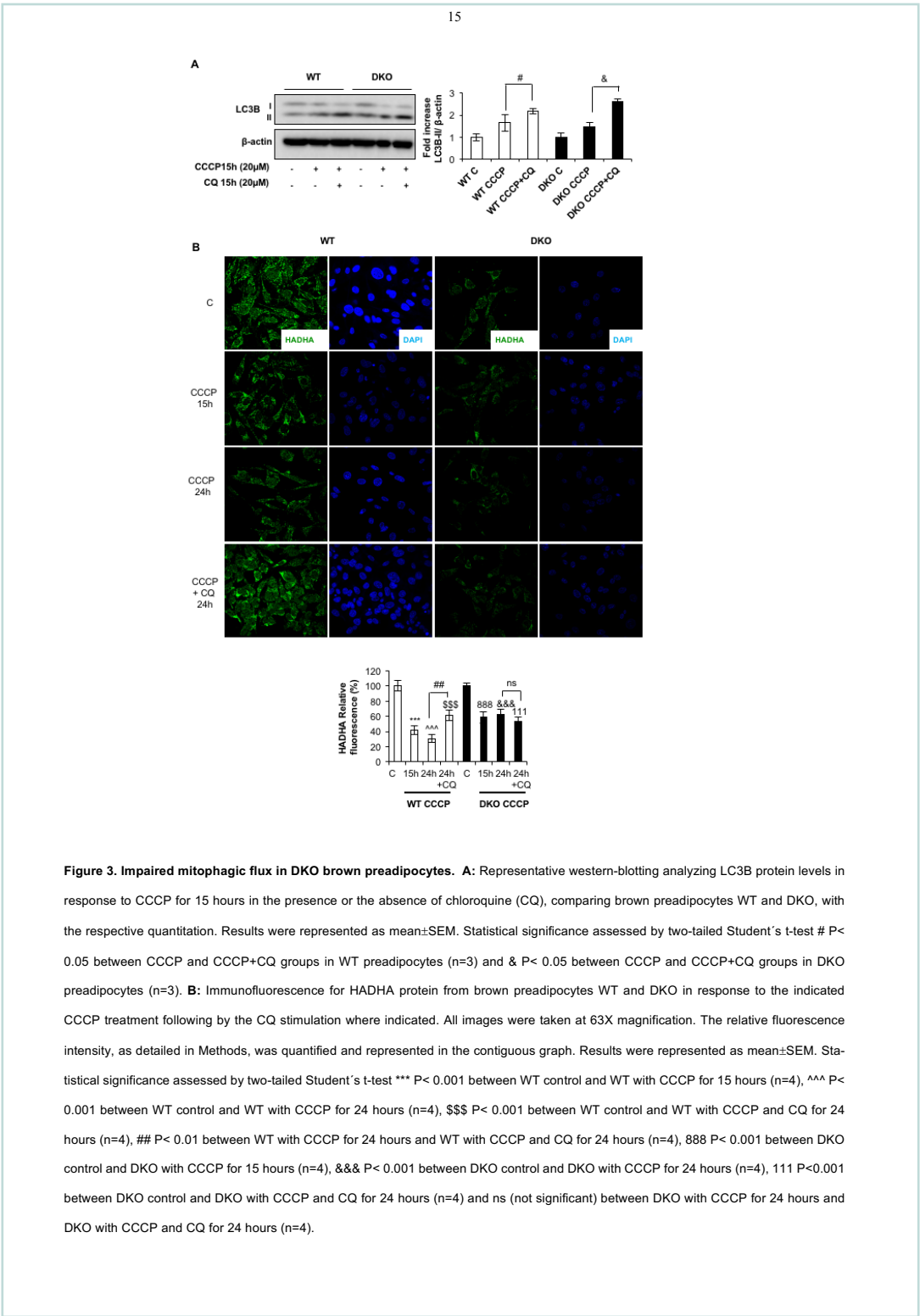


Figure 3. Impaired mitophagic flux in DKO brown preadipocytes. **A:** Representative western-blotting analyzing LC3B protein levels in response to CCCP for 15 hours in the presence or the absence of chloroquine (CQ), comparing brown preadipocytes WT and DKO, with the respective quantitation. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance assessed by two-tailed Student’s t-test # $P < 0.05$ between CCCP and CCCP+CQ groups in WT preadipocytes (n=3) and & $P < 0.05$ between CCCP and CCCP+CQ groups in DKO preadipocytes (n=3). **B:** Immunofluorescence for HADHA protein from brown preadipocytes WT and DKO in response to the indicated CCCP treatment following by the CQ stimulation where indicated. All images were taken at 63X magnification. The relative fluorescence intensity, as detailed in Methods, was quantified and represented in the contiguous graph. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance assessed by two-tailed Student’s t-test *** $P < 0.001$ between WT control and WT with CCCP for 15 hours (n=4), ^^^ $P < 0.001$ between WT control and WT with CCCP for 24 hours (n=4), \$\$\$ $P < 0.001$ between WT control and WT with CCCP and CQ for 24 hours (n=4), ## $P < 0.01$ between WT with CCCP for 24 hours and WT with CCCP and CQ for 24 hours (n=4), 888 $P < 0.001$ between DKO control and DKO with CCCP for 15 hours (n=4), &&& $P < 0.001$ between DKO control and DKO with CCCP for 24 hours (n=4), 111 $P < 0.001$ between DKO control and DKO with CCCP and CQ for 24 hours (n=4) and ns (not significant) between DKO with CCCP for 24 hours and DKO with CCCP and CQ for 24 hours (n=4).

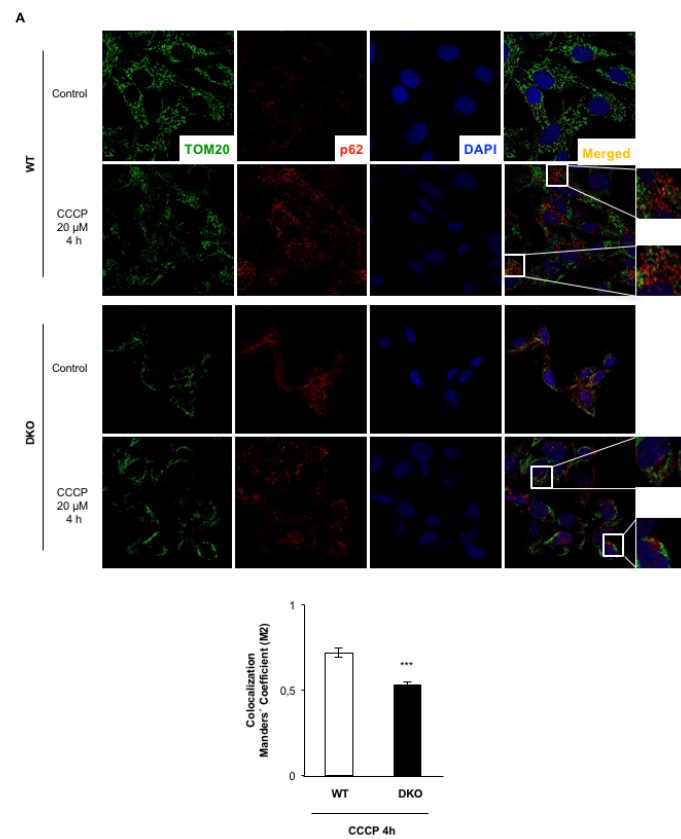


Figure 4. DKO brown preadipocytes showed an impaired p62-TOM20 colocalization upon 4 h CCCP treatment. A: Representative immunofluorescence of TOM20, p62 and DAPI from brown preadipocytes obtained from WT or DKO under control or CCCP treatment. In the CCCP treatment of both cell lines two different regions are amplified in the insets. **B:** After using Coloc2 plug-in, as explained in material and methods section, colocalization Manders' coefficient after CCCP treatment is represented in the graph. Results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by two-tailed Student's t-test *** $P < 0.001$ between WT ($n=3$) and DKO ($n=3$) cells treated with CCCP for 4 hours.

17

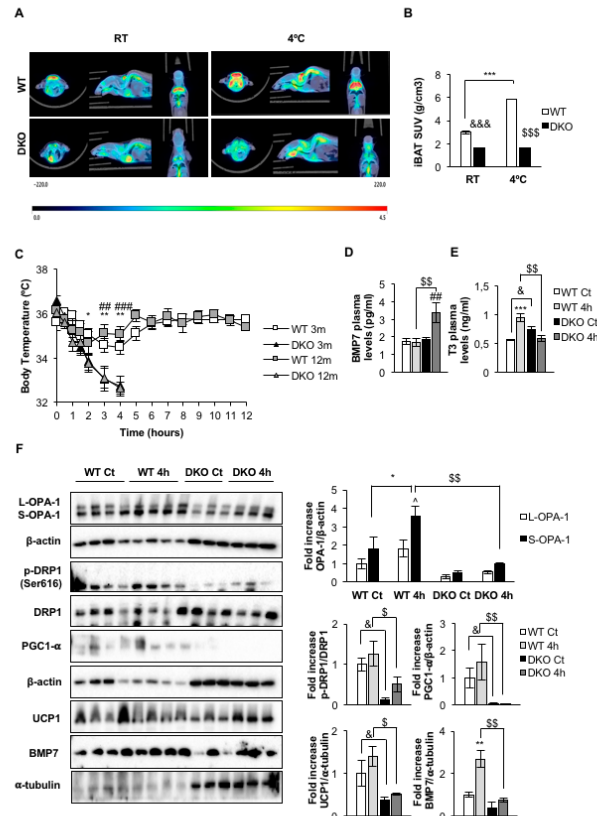


Figure 5. Impaired brown fat thermogenesis and mitochondrial fission mechanisms upon cold exposure in DKO mice. **A:** Representative PET images of iBAT ^{18}F -FDG uptake from 3-month-old WT (n=2) and DKO (n=2) mice at room temperature (left panels) or at 4°C (right panels). **B:** PET quantification showed as SUV value (standard uptake value). Results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by two-way ANOVA followed by the Tukey test. &&& $P < 0.001$ between WT RT and DKO RT groups; \$\$\$ $P < 0.001$ between WT 4°C and DKO 4°C groups and *** $P < 0.001$ between WT RT and WT 4°C groups. **C:** Representative plots of cold-exposure analysis showing the temperature from 0 to 12 h comparing 3-month-old (n=8 WT, n=7 DKO) and 12-month-old (n=4 WT, n=4 DKO) mice. Results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by two-way ANOVA followed by the Tukey test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ between 3-month-old WT and DKO groups, ## $P < 0.01$; ### $P < 0.001$ between 12-month-old WT and DKO groups. **D:** BMP7 plasma levels from 12-month-old WT (n=8 Ct, n=8 4h) and DKO (n=4 Ct, n=4 4h) mice. **E:** T3 plasma levels from 12-month-old WT (n=9 Ct, n=4 4h) and DKO (n=6 Ct, n=4 4h) mice. **F:** Representative western-blotting showing different regulators of mitochondrial dynamics and brown fat functionality of iBAT from 12-month-old WT and DKO mice at thermoneutrality (n= 4 WT, n= 3 DKO) or after 4h of 4°C exposure (n= 4 WT, n= 3 DKO) and its corresponding quantification. Results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by one-way ANOVA (BMP7, T3 plasma levels, p-Drp1/Drp1, PGC1- α , UCP1 and BMP7) or two-way ANOVA (OPA-1) followed by the Tukey test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ between WT Ct and WT 4h groups, ## $P < 0.01$ between DKO Ct and DKO 4h, \$ $P < 0.05$; \$\$ $P < 0.01$ between WT 4h and DKO 4h, & $P < 0.05$ between WT Ct and DKO Ct and ^ $P < 0.05$ between L-OPA-1 WT 4h and S-OPA-1 WT 4h.

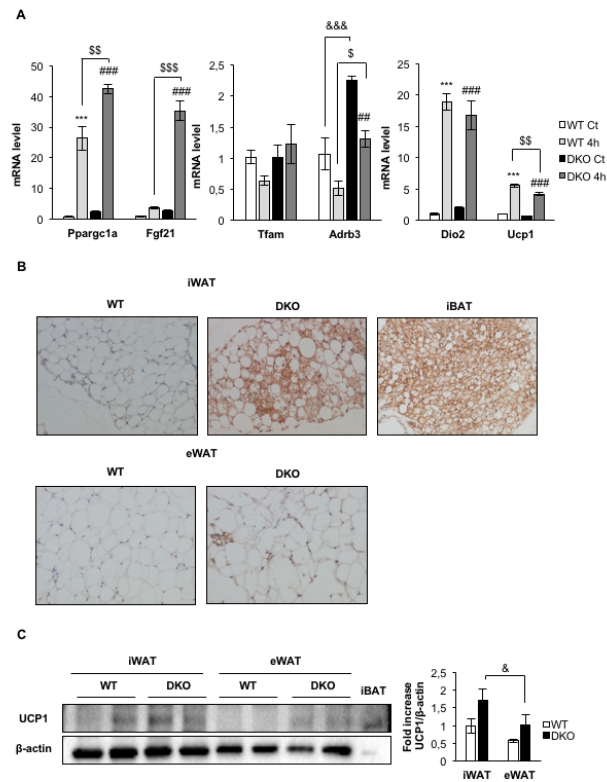


Figure 6. Acute cold induced gene expression and increased browning in inguinal fat depots in DKO mice. **A:** Plot indicating fold-increased mRNA levels of iBAT genes from 12-month-old WT and DKO mice at thermoneutrality (n=3 WT, n=3 DKO) or after 4h of 4°C exposure (n=3 WT, n=3 DKO). Results were represented as mean±SEM. Statistical significance assessed by one-way ANOVA followed by the Tukey test. **** P< 0.001 between WT Ct and WT 4h groups, \$ P< 0.05; \$\$ P< 0.01; \$\$\$ P< 0.001 between WT 4h and DKO 4h, ## P< 0.01; ### P< 0.001 between DKO Ct and DKO 4h and &&& P< 0.001 between WT Ct and DKO Ct. **B:** Immunohistochemistry for Ucp-1 protein (brown stain) in sections of iWAT and eWAT from 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice. iBAT was used as a positive control. All images were taken at magnification, 20X. **C:** Representative blots from UCP1 protein expression in iWAT and eWAT (45µg of protein was loaded) from 3-month-old WT (n=4 animals per tissue) and DKO (n=4 animals per tissue) and its corresponding quantitation. In this blot 5 µg of iBAT were used as a positive control of UCP1 protein expression. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance assessed by one-way ANOVA followed by the Tukey test. & P< 0.05 between iWAT DKO and eWAT DKO groups.

19

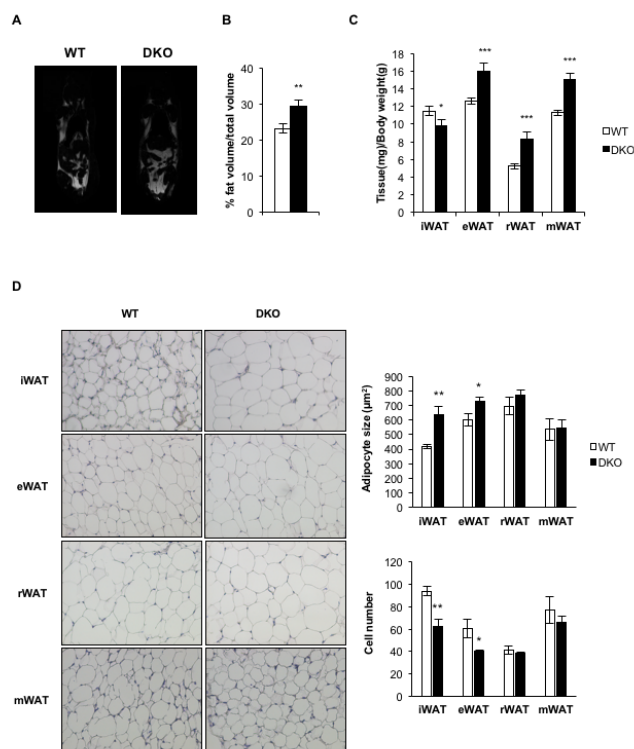


Figure 7. Loss of IGFIR/IR increased obesity susceptibility and induced a redistribution of the adipose organ. **A:** Representative images from NMR comparing WT (n=15) and DKO (n=9) 3-month-old mice. **B:** Quantification of NMR images. The results were represented as the percentage of fat volume per total volume. **C:** Graph representing the eWAT, iWAT, rWAT and mWAT weights per total body weight comparing WT (n=18) and DKO (n=15) 3-month-old mice. **D:** Hematoxylin and eosin stained sections of different WAT depots from 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice. Magnification 20X. White adipocyte size (μm^2) from WAT depots are shown comparing WT (n=3) and DKO (n=3) mice from 3-month-old mice (200 adipocytes per group) at magnification, 20X. Adipocyte number quantification from iBAT compartment comparing 3-month-old WT (n=3) and DKO (n=3) mice from 3-month-old (6 images per group). All results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by two-tailed Student t test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ between WT and DKO groups.

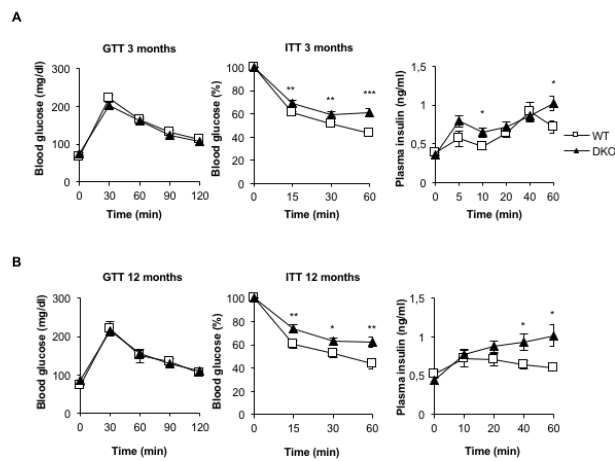


Figure 8. DKO mice showed insulin resistance and moderate hyperinsulinemia. A: Glucose, insulin tolerance tests and insulin plasma levels from 3-month-old WT (n=22 GTT, n=23 ITT, n=7 insulin levels) and DKO (n=13 GTT, n= 19 ITT, n=8 insulin levels) mice. **B:** Glucose, insulin tolerance tests and insulin plasma levels from 12-month-old WT (n=9 GTT, n= 10 ITT, n= 4-7 insulin levels) and DKO (n=15 GTT, n= 18 ITT, n=5-9 insulin levels) mice. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance was assessed by two-tailed Student t test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ between WT and DKO groups.

21

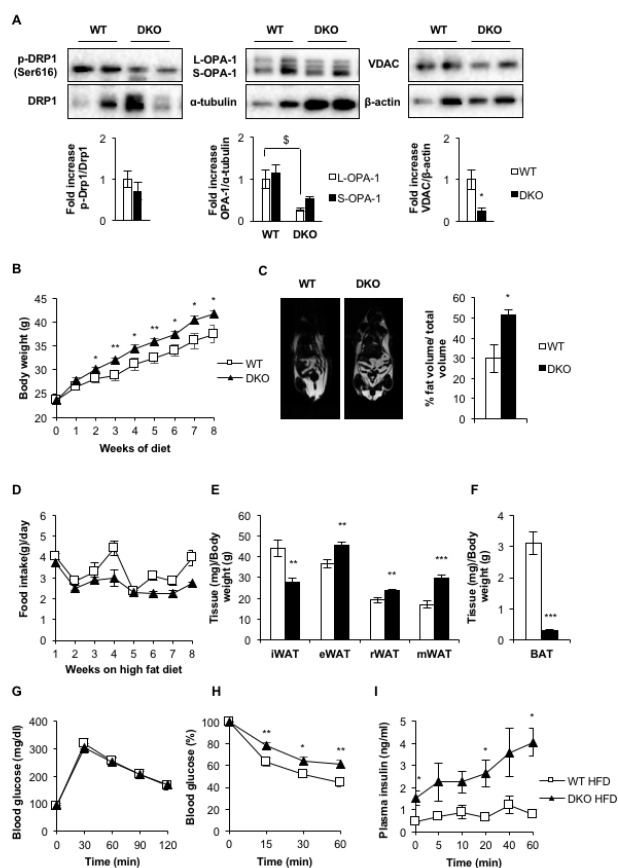


Figure 9. BATIGFIRDKO progressed into a manifest obesity upon excess of energy exposure. **A:** Representative western-blotting from iBAT showing different regulators of mitochondrial dynamics comparing 3-month-old WT (n=3 OPA-1, n=4 p-Drp1/Drp1 and VDAC) and DKO (n=3 OPA-1, n=4 p-Drp1/Drp1 and VDAC) mice fed with HFD for 8 weeks and its corresponding quantitation. **B:** Body weight of male WT (n=8) and DKO (n=13) mice fed with HFD for 8 weeks. **C:** Representative images from NMR comparing WT (n=2) and DKO (n=3) mice fed with HFD for 8 weeks. Quantification of NMR images was represented as the percentage of fat volume per total volume. **D:** Food intake of WT (n=3) and DKO (n=3) mice fed with HFD for 8 weeks. **E:** Graph representing the eWAT, iWAT, rWAT and mWAT weights per total body weight comparing WT (n=6) and DKO (n=8) mice fed with HFD for 8 weeks. **F:** Graph indicating the iBAT weight/body weight ratio from WT (n=6) and DKO (n=8) mice fed with HFD for 8 weeks. **G:** Glucose tolerance test from WT (n=8) and DKO (n=11) mice fed with HFD for 8 weeks. **H:** Insulin tolerance test from WT (n=9) and DKO (n=12) mice fed with HFD for 8 weeks. **I:** Insulin plasma levels from WT (n=6) and DKO (n=5) mice fed with HFD for 8 weeks. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance was assessed by two-tailed Student t test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 between WT and DKO groups. Statistical significance of OPA-1 was assessed by 1-way ANOVA followed by the Tukey test. \$ P < 0.05 L-OPA-1 between WT and DKO groups.

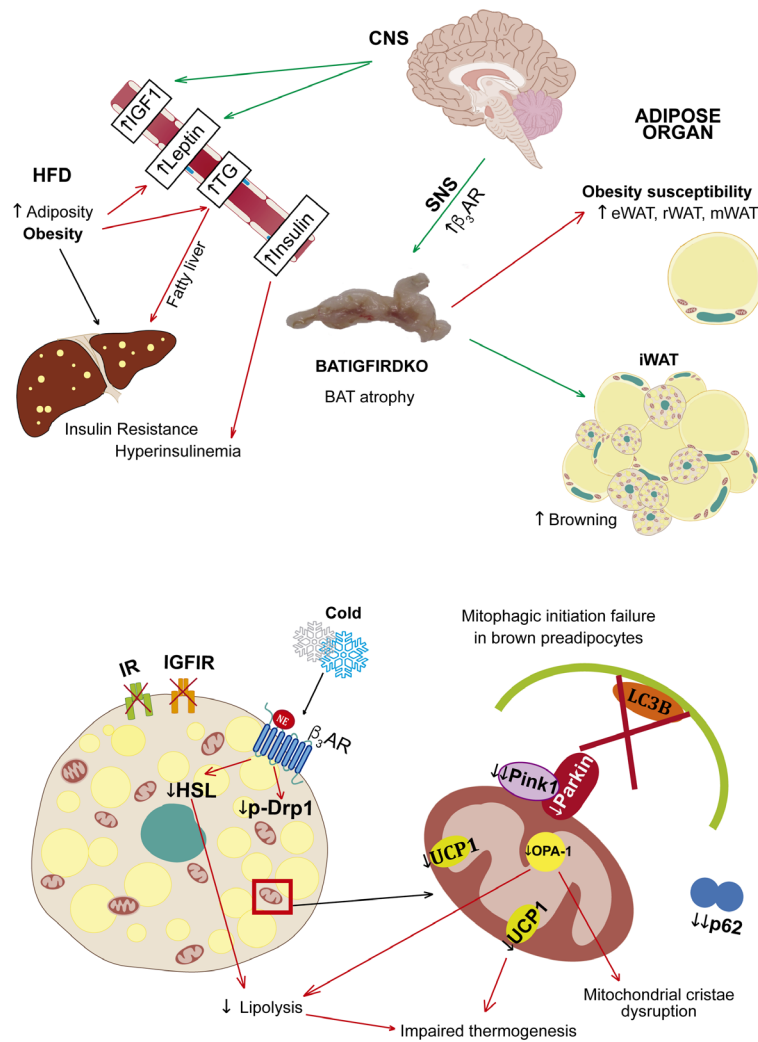
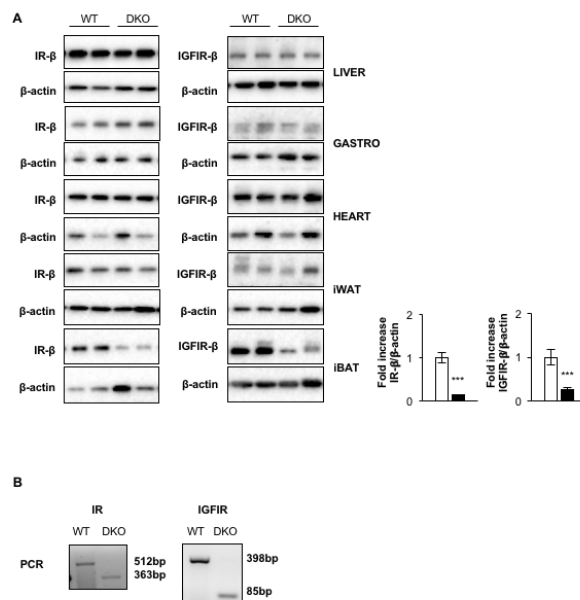
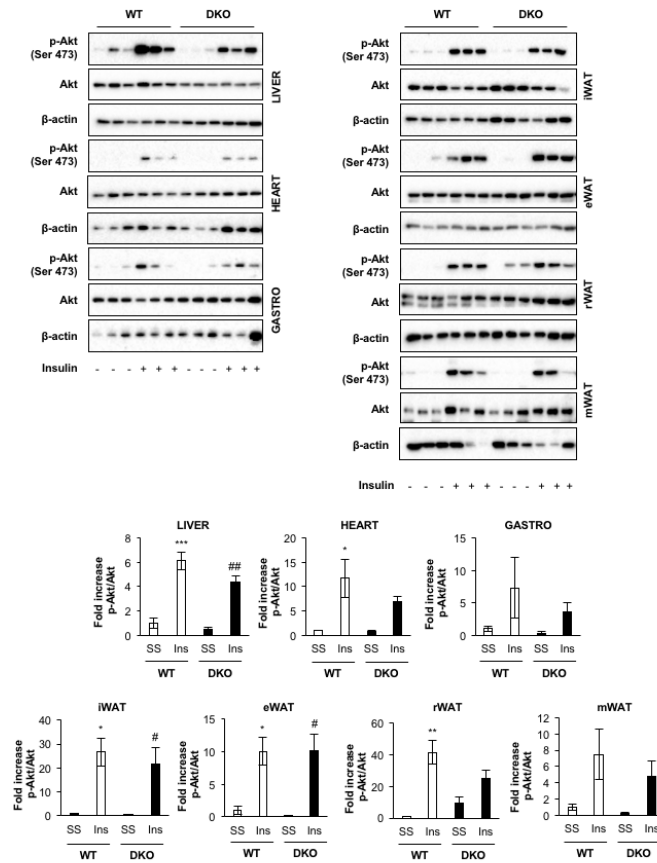


Figure 10. Primary phenotype and the underlying mechanisms involved and secondary phenotype in BATIGFIRKO mice. Lack of IGFIR/IR caused a severe brown fat atrophy and mitochondrial damage related to cristae disruption and also the loss of essential components of the protein machinery involved in the mitochondrial integrity quality control in the remnant tissue. More importantly, DKO showed an impaired brown fat thermogenesis upon cold exposure based on a failure in the mitochondrial fission mechanisms and a much lower UCP1 content. However, DKO mice increased the number of beige cell clusters observed within the inguinal fat. As a result, DKO mice showed an obesity susceptibility as revealed by increased body fat mass and insulin resistance. Upon excess of energy exposure, DKO versus control mice showed a manifest obesity revealed by the increased body weight, increased adiposity, insulin resistance hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, mobilizing lipids to peripheral tissues as the liver.



Supplementary Figure S1. IGFIR/IR tissue-specific deletion in DKO versus control mice. A: IR and IGFIR protein expression in liver, gastrocnemius, heart, iWAT and iBAT from 3-month-old WT (n=6) and DKO (n=6). iBAT quantification was represented. **B:** PCR analysis of iBAT cDNA showed exon 3 and 4 deletion in DKO mice. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance was assessed by two-tailed Student t test. *** P< 0.001 between WT and DKO groups.



Supplementary Figure S2. Differential tissue-specific insulin sensitivity in DKO versus control mice. A: After 1 U/kg body weight of human insulin injection, insulin signaling was measured in liver, hear, gastro, iWAT, eWAT, rWAT and mWAT compartments from 3-month-old WT (n=3 SS, n=3 Ins) and DKO (n=3 SS, n=3 Ins) mice. The corresponding quantitation is presented below indicating the fold-increase of phospho-Akt/Akt. Results were represented as mean \pm SEM. Statistical significance assessed by one-way ANOVA followed by the Tukey test. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 between WT SS and WT Ins. # P < 0.05; ## P < 0.01 between DKO SS and DKO Ins.

	WT 3m	DKO 3m	WT HFD	DKO HFD
T3 (ng/ml)	0,62±0,01 (n=11)	0,68±0,02 (n=6)	0,55±0,01 (n=4)	0,47±0,03 ⁱ (n=6)
IGF-1 (ng/ml)	133,42±10,47 (n=11)	272,75±18,79 ^a (n=6)	251,75±24,92 (n=4)	356,62±48,48 ^{c, h} (n=3)
BMP7 (pg/ml)	1,32±0,10 (n=13)	1,49±0,09 (n=12)	2,17±0,28 (n=7)	2,08±0,23 ^g (n=4)
Insulin (ng/ml)	0,69±0,05 (n=10)	0,78±0,12 (n=9)	0,53±0,19 (n=4)	4,77±1,52 ^{c, i} (n=4)
Glucose (mg/dl)	145,47±4,28 (n=19)	149,21±4,81 (n=19)	149,66±7,29 (n=6)	141±4,38 (n=10)
TG (mg/dl)	30,58±2,79 (n=7)	80,75±7,94 ^c (n=6)	41,26±4,35 (n=5)	88,94±8,16 ^c (n=4)
Cholesterol (mg/dl)	104,31±9,83 (n=8)	102,80±5,58 (n=8)	141,84±14,45 (n=8)	135,06±8,23 (n=6)
Leptin (ng/ml)	3,17±0,43 (n=8)	4,35±0,58 (n=8)	25,97±1,59 ^f (n=9)	27,52±3,46 ⁱ (n=9)
Adiponectin (ng/ml)	17,29±0,37 (n=12)	16,83±0,33 (n=12)	33,01±1,30 ^f (n=8)	31,37±1,09 ⁱ (n=8)
TNF-α (pg/ml)	4,26±0,38 (n=11)	4,10±0,34 (n=10)	3,57±0,39 (n=4)	3,97±0,31 (n=5)

Supplementary Table S1. Metabolic and endocrine status at 3 months or upon excess energy exposure in DKO versus control mice. Changes in fed plasma levels of endocrine signals such as IGF1, T3, BMP-7, insulin, leptin, adiponectin, and TNF-α and metabolites such as glucose or triglycerides are shown comparing WT and DKO mice fed with standard or high fat diet. Results were represented as mean±SEM. Statistical significance assessed by one-way ANOVA followed by the Tukey test. ^a P< 0.05, ^b P<0.01, ^c P< 0.001 between WT and DKO or WT HFD and DKO HFD; ^d P< 0.05, ^e P< 0.01, ^f P< 0.001 between WT and WT HFD; ^g P< 0.05, ^h P< 0.01, ⁱ P< 0.001 between DKO and DKO HFD.

Curriculum Vitae

Información Personal

Apellidos/Nombre	Viana Huete, Vanesa
Dirección	C/ Gondola, 6, 4ºD Arganda del Rey, 28500 (Madrid)
Teléfono fijo/móvil	918701561 / 649774646
E-mail	vanesa.viana.h@gmail.com
Nacionalidad	Española
Fecha de nacimiento	28/04/1987

Experiencia Laboral

Abril 2012-Noviembre 2016	Becaria predoctoral FPI (Formación Personal Investigador)
Proyecto	"Papel de los receptores de IGF1 e insulina en el desarrollo y funcionalidad del tejido adiposo marrón: regulación del balance energético" (director Manuel Román Benito de la Heras)
Funciones y responsabilidades principales	Caracterización de modelos animales: test de tolerancia a la glucosa e insulina, ELISAS, cuantificación de la acumulación de grasa mediante RMN, Western blott, q-RTPCR, cultivos celulares, determinación de la función termogénica mediante experimentos de exposición aguda al frío, histología y estudio del consumo energético mediante jaulas metabólicas
Nombre y dirección del centro	Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid
Mayo 2015-Septiembre 2015	Estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Orian Shirihai, bajo la dirección del Dr. Marc Liesa Roig.
Proyecto	Estudio del papel de los receptores de IGF1 e insulina en la dinámica y respiración mitocondrial del tejido adiposo marrón
Nombre y dirección del centro	Medicine Department. Boston University.
Cursos 2015- 2016, 14/15, 13/14	
Cargo desempeñado	Colaboración en docencia práctica (165h)
Funciones y responsabilidades principales	Prácticas de laboratorio de Bioquímica II y Biología Molecular (2º curso del Grado en Farmacia) y prácticas de laboratorio de Bioquímica I (1er curso del Grado en Farmacia)
Nombre y dirección de la empresa	Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

Septiembre 2010- Abril 2012	Colaboración en el proyecto Estrés de retículo endoplásmico e inflamación: papel de los linfocitos T "no convencionales" bajo la dirección de Dr. Eduardo Martínez Naves y Dr. Manuel Gómez del Moral en el departamento de Inmunología (Facultad de Medicina, UCM).
Principales materias /competencias profesionales cubiertas	Manejo de animales de experimentación, técnicas de biología molecular (PCR, q-PCR, obtención DNA y RNA, Western blott), cultivos celulares, ficoll, marcajes, ELISA, citometría de flujo, extracción de linfocitos intraepiteliales de intestino.
Curso 2010- 2011	
Cargo desempeñado	Colaboración en la enseñanza de Inmunología (6h)
Funciones y responsabilidades principales	Prácticas de Laboratorio (Grado en Medicina)
Nombre y dirección de la empresa	Departamento de Microbiología I, Área de Inmunología Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid
Julio 2007- Septiembre 2007	
Cargo desempeñado	Ayudante de dependienta
Funciones y responsabilidades principales	Atención al cliente, realización de inventarios y control del stock.
Nombre y dirección de la empresa	Artificia Franquicia S.L. C/ Galeon, 26 28042 (MADRID)
Educación y Formación	
Octubre 2010- Junio 2011	Máster Interuniversitario de Investigación en Inmunología
Principales materias /competencias profesionales cubiertas	Inmunología celular y tisular, I. molecular, Inmunotecnología, Interacción patógeno Inmunidad, modelos animales, I. humana, Inmunopatología Trabajo fin de Máster: Estudio de la regulación de la expresión de MR1 (MHC related protein 1) por ATRA (All Trans Retinoic Acid) y RSG (rosiglitazona)
Nota media	9,09 (2,95)
Nombre del centro de estudios	Facultad de Medicina (UCM)
Octubre 2009- Junio 2010	Beca de Colaboración en el Departamento de Inmunología bajo la tutela de los profesores D. Eduardo Martínez Naves y D. Manuel Gómez del Moral.
Nombre del centro de estudios	Facultad de Medicina (UCM)
Capacidades adquiridas	Cultivos celulares, extracción RNA, RT-PCR, q-PCR, Ficoll, geles de electroforesis, marcajes, citometría de flujo

Octubre 2005- Junio 2010	
Título	Licenciada en Biología
Especialidad	Biología Sanitaria
Nota media	7, 86 (2,24)
Nombre del centro de estudios	Universidad Complutense de Madrid
Cursos	
Septiembre 2016	
Título	Curso de normas de buena práctica clínica (BPC) para investigadores y colaboradores de ensayos clínicos(12h).
Nombre del centro de estudios	Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid
Septiembre 2016	
Título	New complications of the diabetic syndrome in the new millenium: Type 3 diabetes (12h).
Nombre del centro de estudios	Universidad Internacional Menéndez Pelayo, Santander.
Abril 2015	
Título	II Curso Avanzado sobre Obesidad (16h)
Nombre del centro de estudios	Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid
Septiembre 2013	
Título	Business Skills in English: Presentation Skills. Intermediate Level: B2. (7h)
Nombre del centro de estudios	Living English. Training & Empowering Professionals, Madrid.
Octubre 2010	
Título	Manifestaciones clínicas de las Inmunodeficiencias Primarias (14h)
Nombre del centro de estudios	Hospital Universitario La Paz, Madrid.
Julio 2007	
Título	Curso de Nutrición y Dietética: Evolución de los conocimientos y nuevas perspectivas (100h)
Nombre del centro de estudios	Escuela Complutense de Verano (UCM), Madrid.

Septiembre 1998-Junio 2000	
Título	Mecanografía por Ordenador
Nombre del centro de estudios	Instituto de Estudios Mega, Arganda del Rey (Madrid)
Publicaciones	
Autores	Viana-Huete V , Guillén C, García G, Fernández S, García-Aguilar A, Kahn CR, Benito M.
Título	Brown fat-specific double knockout of IGFIR/IR: Atrophy, uncoupling mechanisms failure, impaired thermogenesis and obesity. 2017. (En revision)
Autores	Viana-Huete V , Guillén C, García-Aguilar A, García G, Fernández S, Kahn CR, Benito M.
Título	Essential Role of IGFIR in the Onset of Male Brown Fat Thermogenic Function: Regulation of Glucose Homeostasis by Differential Organ-Specific Insulin Sensitivity.
Revista	Endocrinology (Medline 26910308) Año:2016 Volumen: 157 (4) Páginas: 1495-1511
Autores	Abós-Gracia B, del Moral MG, López-Relaño J, Viana-Huete V , Castro L, Villalba M, Martínez-Naves E.
Título	Olea europaea pollen lipids activate invariant natural killer T cells by upregulating CD1d expression on dendritic cells.
Revista	The Journal of Allergy and Clinical Immunology (Medline 23265858) Año: 2013 Volumen: 131 (5) Páginas: 1393-1399
Autores	Abós B, Gómez Del Moral M, Gozalbo-López B, López-Relaño J, Viana V , Martínez-Naves E.
Título	Human MR1 expression on the cell surface is acid sensitive, proteasome independent and increases after culturing at 26°C.
Revista	Biochemical and Biophysical Research Communications (Medline 21777569) Año: 2011 Volumen: 411 (3) Páginas: 632-636
Proyectos	
2012-2014	
Título	Role of brown adipose tissue and resident brown adipocytes formation and function in the pathogenesis of obesity and its diabetic complications: recovery of brown fat functionality as antiobesity treatment
Entidad Financiadora	Plan Nacional de I+D+I del Ministerio de Ciencia e Innovación
Cargo	Becaria predoctoral FPI

Seminarios y Congresos	
Madrid, 7-8 Julio 2016	Type 2 diabetes: etiology, complications and new perspectives Mechanism of Insulin Resistance (MOIR)
Barcelona, 11-13 Mayo 2016	Ciberdem (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas) Annual Meeting
Trabajo	Essential role of IGF1R and IR in the regulation of brown adipose tissue development and thermogenesis
Autores	Viana-Huete V; Guillen C, Garcia G, Fernandez S, Garcia-Aguilar A, Kahn CR and Benito M
Madrid, 1-2 Diciembre 2015	Simposio Internacional "lo ultimo en obesidad". Fundación Ramón Areces
Barcelona, 7-9 Noviembre 2013	XII International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action: New opportunities for the prevention and treatment of diabetes in the XII century.
Trabajo	New mouse model for the study of brown fat dysfunction, energy imbalance and obesity prone (oral presentation)
Autores	Nieto-Vazquez, I; Viana-Huete, V; Garcia-Gomez, G; Benito, M
Barcelona, 23-27 Septiembre 2013	49th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes
Trabajo	Role IGF1R in the regulation of brown fat function and energy balance (oral presentation)
Autores	V. Viana-Huete, I. Nieto-Vazquez, A. Talavera-Pardo, G. Garcia Gomez, M. Benito
Barcelona, 22 Septiembre 2013	6th Ciberdem (Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas) Annual Meeting
Madrid, 18-19 Abril 2013	Primer simposium MOIR (Mechanisms of Insulin Resistance)
Madrid, 7 Octubre 2011	3ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid
Madrid, 20 Junio 2011	II Seminario de Formación en Protección Radiológica Servicio de Prevención de Riesgos Laborales y Medicina del Trabajo (UCM)
Pamplona, 8-11 Junio 2011	XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología
Trabajo	Efecto in vitro de la Lenalidomida sobre células dendríticas humanas
Autores	J. López Relano, M.M. Gómez del Moral Martín Consuegra, B. Abós Gracia, V. Viana Huete, E. Martínez Naves

Trabajo	Micropartículas de Silicio Mesoporoso aumentan la presentación antigénica cruzada por MHC de clase I de células dendríticas humanas															
Autores	M. Gómez del Moral Martín, B. Abós Gracia, J. López Relaño, V. Viana Huete, E. Matveyeva, E. Martínez Naves y A. Jiménez Periañez															
Trabajo	Lípidos procedentes del polen de olivo (Olea Europaea) son capaces de inducir una respuesta en células iNKT humanas a través de CD1d															
Autores	B. Abós Gracia, M. Gómez del Moral Martín Consuegra, J. López Relaño, V. Viana Huete, L. Castro de las Cuevas, M. Villalba Díaz y E. Martínez Naves															
Madrid, 19 Octubre 2010	Seminario de Cultivos Celulares organizado por LGC Standards-ATCC Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)															
Madrid, 15 Octubre 2010	2ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid															
Capacidades personales																
Lengua materna	Español															
Otros idiomas																
Autoevaluación	<table><tr><th colspan="2">Comprensión</th><th colspan="2">Habla</th><th>Escritura</th></tr><tr><td>Comprensión auditiva</td><td>Lectura</td><td>Interacción oral</td><td>Capacidad oral</td><td></td></tr><tr><td>Medio</td><td>Medio</td><td>Medio</td><td>Medio</td><td>Medio</td></tr></table>	Comprensión		Habla		Escritura	Comprensión auditiva	Lectura	Interacción oral	Capacidad oral		Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
Comprensión		Habla		Escritura												
Comprensión auditiva	Lectura	Interacción oral	Capacidad oral													
Medio	Medio	Medio	Medio	Medio												
Inglés (B2.1)																
Capacidades y competencias informáticas																
	<ul style="list-style-type: none">- Windows 10/7 y Mac OS nivel usuario- Microsoft Office nivel usuario- 250 pulsaciones/min, elaboración de documentos comerciales, cartas, certificados, instancias, oficios, vales y recibos- Manejo software ImageJ, Corel Draw X6, GraphPad Prism 5 y TSE Phenomaster															
Otras capacidades y competencias																
	<ul style="list-style-type: none">- Capacidad de trabajo en equipo- Capacidad para contribuir en equipos multidisciplinares															
Permiso de conducir	Tipo B (2014)															

